

Bioatividade de pigmentos antociânicos e de novos derivados lipofílicos para aplicação na indústria cosmética

Ana Évora

Mestrado em Bioquímica

Departamento de Química e Bioquímica

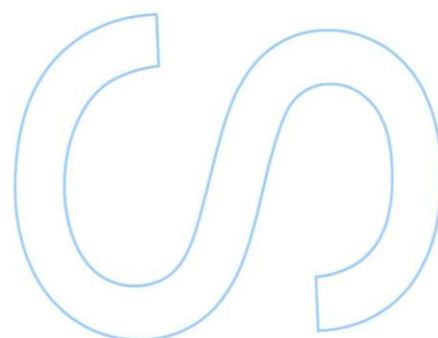
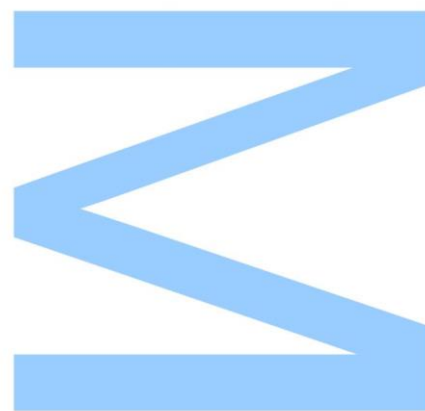
2017

Orientador

Iva Fernandes, Investigadora Pós-doc., Faculdade de Ciências

Coorientador

Nuno Mateus, Professor Associado, Faculdade de Ciências



Agradecimentos

Este trabalho foi realizado graças ao apoio financeiro da FCT/MEC, com fundos nacionais cofinanciados pela FEDER, através do acordo PT2020 (UID/QUI/50006/2013 – POCI/01/0145/ FEDER/007265).

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração e o apoio de várias pessoas e instituições. Desta forma, gostaria de expressar o meu mais sincero agradecimento:

À Doutora Iva Fernandes, orientadora deste trabalho, pelo seu apoio incansável e disponibilidade total, pelo seu otimismo (que sempre contrariou o meu pessimismo), pela paciência, dedicação e constantes sugestões e críticas que sempre permitiram enfrentar e ultrapassar os diferentes obstáculos e crescer cientificamente.

Ao Professor Doutor Nuno Mateus, co-orientador desta dissertação, pela confiança que depositou na realização deste trabalho e dinamismo constantes, que permitiram desbloquear etapas e seguir sempre em frente.

Ao Professor Doutor Victor Freitas por toda a dedicação a este laboratório e permitir que o grupo cresça sempre.

Ao Luís pela orientação ao longo deste ano e por me mostrar que a química pode ser mágica.

À Marta pela colaboração sempre disponível e constante e por ser uma trabalhadora incansável.

A todos os elementos do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências que em algum momento contribuíram para a realização deste trabalho.

A todas as pessoas que trabalham no laboratório de Química Orgânica por terem tornado os dias alegres e mais leves. Em especial aos meus colegas de laboratório: Paulinha, Rosa, Hélder, Elsa, Nacho, Susana, Luísa, Ana Gomes, Joana Brás, Vânia, Telmo, Ana Luísa, Natércia, Joana Azevedo, Joana Oliveira, Abigail, Ana Reis, e Sofia. Pelas horas de almoço sempre bem-dispostas, pelos docinhos e cafés e pela disponibilidade total, pois aprendi algo com cada um.

Aos amigos, por tudo o que me ensinaram e por tudo o que me permitiram viver convosco ao longo dos anos. À Mafalda, companheira de laboratório e do café e amiga para a vida, pelos risos e sorrisos, pelas conversas da vida no geral e no particular, pelo apoio incondicional em todos os momentos e por todos os mimos. À Ana Sá, minha fiel companheira do ERASMUS+, com quem já aprendi tanto e com quem tenho tanto a aprender, por sempre acreditares em mim e por seres a pessoa mais genuína que

conheço. À Sara Carvalho por me ouvir em todos os momentos, por rir e chorar comigo e por ser a minha sonhadora, que sempre me faz acreditar que é possível. À Fabiana Mendes, amiga de todas as horas e com quem já vivi tanto, por me dares sempre tanta força. Aos meus companheiros do Mestrado (Rui, Ricardo, Daniela, Mariana e Diana) por todos os jogos de sueca e todos os cafés confortantes ao longo deste ano. À Paula Quental, por ser uma professora que se tornou numa amiga e com quem volto sempre ao lema – trabalhar muito para conhecer sempre mais.

Aos meus pais, porque sem eles nunca teria chegado até aqui. Pela educação que me deram e pelo apoio às minhas escolhas. Por me lembrarem que a vida pode ser difícil, mas que com trabalho e dedicação é possível ser-se sempre mais.

Ao meu irmão, porque me mostrou que uma paixão é mais importante que qualquer grau obtido e que o trabalho constante levará sempre ao cumprir dos sonhos.

Ao Ricardo, por tudo. Por estar sempre presente e por sempre me fazer rir. Pelas palavras de encorajamento e pela santa Paciência em me ouvir, dia após dia, as lutas e frustrações interiores. Por ser um modelo de investigador curioso e rigoroso e por querer fazer sempre o melhor. Por ser uma pessoa genuína e sincera que admiro muito e a quem devo o dia-a-dia cheio de alegria.

Lista de Publicações

Esta dissertação foi realizada no Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e integra resultados que foram publicados em congressos científicos através de comunicações em painel e em revistas de circulação internacional com arbitragem científica:

Artigos em revistas de circulação internacional com arbitragem científica:

1. Cruz, L., M. Guimarães, P. Araújo, **A. Évora**, V. De Freitas, N. Mateus (2017) Malvidin-3-glucoside-Fatty acid conjugates: from hydrophilic towards lipophilic derivatives. J. Agric. Food Chem: 10.1021/acs.jafc.6b05461.
2. **Évora, A.**, V. de Freitas, N. Mateus, I. Fernandes (2017) Effect of anthocyanins from red wine and blackberry on the integrity of a keratinocyte model using ECIS. Food & Function: 10.1039/C7FO01239J.

Comunicações Orais:

1. **Évora A.**, I. Fernandes, M. Guimarães, L. Cruz, V. de Freitas, N. Mateus (2017) New anthocyanin derivatives for technological applications in the cosmetic industry. IJUP - Investigação Jovem na Universidade do Porto, 2017.
2. Mateus N., I. Fernandes, L. Cruz, **A. Évora**, M. Guimarães, V. de Freitas (2017) ANTHO4SKIN – Recycling anthocyanins to produce anthocyanin derivatives for cosmetic applications. 21st Annual Green Chemistry & Engineering Conference, Portland, Oregon, USA
3. Fernandes I., **A. Évora**, V. de Freitas, N. Mateus (2017) ANTHO4SKIN – Recycling anthocyanins for cosmetic applications. 8th International Conference on Polyphenols and Health, 3rd to 6th October, 2017, Québec, Canada.

Comunicações em Painel:

1. Fernandes I., **A. Évora**, M. Guimarães, L. Cruz, V. de Freitas, N. Mateus (2016) New anthocyanin derivatives for technological applications in the cosmetic industry. XXII Encontro Luso-Galego de Química; Bragança, Portugal.
2. **Évora A.**, I. Fernandes, V. de Freitas and N. Mateus (2017) Anthocyanins towards skin-care: a keratinocyte barrier model using ECIS. XXV Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química, Lisboa, Portugal.

3. Évora A., I. Fernandes, L. Moreira, L. Cruz, M. Guimarães, V. de Freitas, N. Mateus (2017). New anthocyanin derivatives for application in cosmetics. XXV Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química, Lisboa, Portugal.

Resumo

Este trabalho pretendeu explorar a bioatividade de certas antocianinas em células da pele, com vista a explorar o potencial de utilização destes compostos em formulações de cosmética, como substituintes de compostos sintéticos e adjuvantes ao tratamento do envelhecimento da pele. As antocianinas são polifenóis da classe dos flavonóides e responsáveis pelas cores ciânicas de grande parte dos frutos e flores das angiospérmicas e possuem diversas atividades biológicas como um grande poder antioxidante, anti-microbial e ainda atividade antiproliferativa. Estes compostos foram extraídos de duas fontes alimentares: vinho e amora, sendo que os pigmentos maioritários de cada extrato, malvidina-3-glucósido (mv3glc) e cianidina-3-glucósido (cy3glc), respetivamente, foram isolados. Avaliou-se a capacidade antiproliferativa destas antocianinas numa linha imortal normal de queratinócitos humanos (HaCat) através de um ensaio de SRB. Este ensaio validou estudos posteriores, revelando que estes metabolitos não comprometem a proliferação da linha celular maioritária da epiderme, até uma concentração de 100.00 μ M. Otimizou-se um modelo de monocamada de queratinócitos no sistema de *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* (ECIS), que tem por base a leitura da impedância de células em cultura, em tempo real. Realizaram-se, então, dois ensaios de citotoxicidade, o que permitiu a validação deste tipo de testes como rotina para outros compostos. O primeiro ensaio teve por base o modelo de Giaver e Keese que permite o cálculo de três parâmetros celulares: a função de barreira, a distância célula-matriz extracelular e a capacitância de membrana, tendo sido verificado que, para uma concentração de 20.00 μ M, os metabolitos não alteram nenhum destes parâmetros relativamente ao controlo. O segundo ensaio teve por base a análise dos micromovimentos celulares e, mais uma vez, se verificou que as antocianinas não apresentam citotoxicidade para esta linha celular. Realizaram-se ainda ensaios de *wound-healing* recorrendo ao sistema ECIS, por forma a avaliar o efeito dos pigmentos no processo de cicatrização e observou-se que os extratos antociânicos e os seus pigmentos maioritários promovem a recuperação do dano causado à monocamada celular, sendo que a cy3glc e o extrato a partir do qual foi extraída foram os que mais reduziram o tempo de recuperação, seguidos pela mv3glc e, finalmente pelo vinho.

Numa segunda parte deste trabalho, realizaram-se ensaios de atividade enzimática, tendo sido avaliado o efeito dos pigmentos na atividade da collagenase, da elastase e da tirosinase. As antocianinas mostraram ter efeito inibitório nas enzimas responsáveis pela manutenção da matriz extracelular, sendo que o extrato de amora e a cy3glc apresentaram o efeito mais acentuado na inibição da elastase, enquanto que no caso da collagenase o extrato de vinho foi o inibidor mais potente. Os metabolitos foram

também capazes de inibir a atividade da tirosinase, tendo-se verificado que a mv3glc é o inibidor mais forte da enzima.

Por fim, sintetizaram-se novos derivados lipofílicos de mv3glc. Testou-se a influência da cadeia carbonada no poder antioxidante deste polifenol, observando-se um aumento dessa atividade para os compostos esterificados com uma cadeia carbonada até oito carbonos. Realizaram-se ainda ensaios de atividade antiproliferativa, por forma a validar estudos posteriores de bioatividade em células da pele e observou-se que a introdução da cadeia até oito carbonos não altera o efeito da antocianina original.

Palavras-Chave:

Antocianinas, vinho, amora, mv3glc, cy3glc, queratinócitos, HaCat, citotoxicidade, micromovimentos, ECIS, *wound-healing*, cicatrização, collagenase, elastase, tirosinase, derivados lipofílicos, antioxidante, antiproliferativo.

Abstract

The bioactivity of some anthocyanins towards skin cells was studied to understand the potential role of these pigments in cosmetic formulations. Anthocyanins are polyphenols arising from plant secondary metabolism that have been shown to display many bioactive properties such as free radical scavenging, antimicrobial, and chemopreventive activities. These compounds were extracted from two food resources: wine and blackberries, and their main pigments, malvidin-3-glucoside (mv3glc) and cyanidin-3-glucoside (cy3glc), respectively, were isolated. First, the antiproliferative activity of these compounds towards a human skin cell line of keratinocytes (HaCat cells) was assessed and, up to 100.00 μM , the pigments showed no great toxicity. This assay validates further ones, since it revealed that anthocyanins do not have a great impact on keratinocyte proliferation, which are the main cell type present in the outer layer of the skin. A model of keratinocyte monolayer in culture was optimized using the system Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS), which is based on impedance measures of cells cultivated on top of small electrodes. Cytotoxicity assays were performed using this system. The first assay was performed using Giaver and Keese ECIS model, which allows for the calculus of three important cellular parameters: barrier function, cell-matrix and membrane capacitance. Compounds were tested at 20.00 μM and it was observed that anthocyanins had no effect on these parameters, not altering the cellular interactions with matrix, neither altering their membranes or contacts between cells. In another assay, the effect of the compounds on cellular micromotion was evaluated, and, again, no effect was observed for the anthocyanins concluding that, at this concentration, the studied pigments present no cytotoxicity towards these skin cells. To evaluate the effect of anthocyanins in the cicatrization phenomenon, namely the effect on wound recovery of a keratinocyte monolayer, a wound-healing assay was performed on ECIS. An electric damage was applied to an HaCat monolayer and it was observed that both the extracts and their major pigments possess a positive effect on the recovery from the wound. Cy3glc and the blackberry extract presented the best results, reducing the recovery time to half, followed by Mv3glc and the wine extract.

In a second part of this work, the activity of anthocyanins in some essential skin enzymes was assayed. The effect on two major enzymes responsible for extracellular matrix (collagenase and elastase) was evaluated by means of an inhibitory assay, and it was observed that blackberry anthocyanins and cy3glc were the strongest inhibitors. On the other side, wine anthocyanins inhibited elastase to a greater extension than the rest of the compounds. Finally, the effect of these flavonoids on the activity of tyrosinase, the key

enzyme on melanin production, was assessed. Anthocyanins from blackberry and wine showed inhibitory activity against this enzyme, with mv3glc being the strongest inhibitor.

Finally, new lipophilic mv3glc derivatives were synthesized, according to the literature. The influence of the carbon chain in the antioxidant power of the compound was evaluated and it was demonstrated that up to 8 carbons, the carbon chain improves the radical scavenging ability of the new compound when compared to the anthocyanin. Antiproliferative assays were also performed with these new compounds and it was observed that up to 100.00 μ M compounds possess no toxicity towards proliferating keratinocytes.

Key words:

Anthocyanins, wine, blackberries, mv3glc, cy3glc, keratinocytes, HaCat, cytotoxicity, micromotion, ECIS, wound-healing, cicatrisation, collagenase, elastase, tyrosinase, lipophilic derivatives, antioxidant, antiproliferative.

Índice

Agradecimentos	a
Lista de Publicações	III
Resumo.....	V
Palavras-Chave:	VI
Abstract.....	VII
Key words:.....	VIII
Lista de Figuras.....	XIII
Lista de Tabelas.....	XVII
Lista de Abreviaturas.....	XIX
Introdução	1
1. Polifenóis	3
2. Flavonóides	4
3. Antocianinas	5
3.1. Propriedades Químicas e Estruturais	5
3.2. Ocorrência das Antocianinas.....	7
3.3. Influência do pH	8
3.4. Toxicidade.....	9
3.5. Principais propriedades biológicas das antocianinas.....	9
3.5.1. Atividade Antioxidante	10
4. A pele	11
4.1. Estrutura e função	11
4.2. O envelhecimento da pele.....	13
4.3. Prevenção e tratamento do envelhecimento precoce	15
5. Antocianinas como potenciais ingredientes cosméticos.....	18
5.1. Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)	20
5.2. Novos derivados antociânicos	23
5.2.1. Estudo Atividade Antioxidante	24
Objetivos	29

Materiais e Métodos.....	33
1.1. Reagentes.....	33
1.3. Obtenção dos extratos antociânicos e purificação das duas antocianinas maioritárias.....	33
1.4. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	34
1.5. Análise por Cromatografia Líquida com espectrómetro de massa (LC-MS).....	35
1.6. Cultura Celular.....	35
1.7. Ensaio Sulforodamina B (SRB).....	35
1.8. Electric Cell-Substrate Impedance Sensing – ECIS.....	36
1.8.1. Otimização do modelo de monocamada de queratinócitos em ECIS	36
1.8.2. Ensaios Citotoxicidade em ECIS.....	38
1.8.2.1. Controlo Negativo com DMSO.....	38
1.8.2.2. Citotoxicidade dos pigmentos antociânicos	38
1.8.2.3. Ensaio de Wound-healing no Sistema ECIS.....	39
1.9. Ensaios de Atividade Enzimática.....	39
1.9.1. Atividade inibitória da Elastase.....	39
1.9.2. Atividade Inibitória da Colagenase	40
1.9.3. Ensaio de inibição enzimática da Tirosinase	40
1.9.4. Ensaio de Cinética Enzimática da Tirosinase.....	41
1.10. Novos Derivados Acilados.....	41
1.10.1. Acilação enzimática da Malvidina-3-glucósido.....	41
1.10.2. Análise por HPLC-DAD dos novos derivados.....	42
1.10.3. Análise por LC-MS/ESI-MS dos novos derivados.....	42
1.10.4. Ensaio de atividade Antioxidante	42
1.10.5. Ensaio Sulforodamina B (SRB).....	44
1.11. Análise Estatística	45
1. Caracterização e bioatividade dos extratos e pigmentos antociânicos.....	49
1.1. Caracterização dos extratos por HPLC-DAD e LC-MS e purificação das antocianinas maioritárias	49

1.2. Efeito antiproliferativo dos pigmentos antociânicos em queratinócitos.....	50
1.3. Otimização das condições de cultura em sistema ECIS.....	51
1.4. Scan de frequências.....	54
1.5. Ensaio de citotoxicidade	55
1.5.1. Controlo negativo com DMSO	55
1.5.2. Extratos antociânicos e compostos isolados	58
1.6. Efeito dos pigmentos antociânicos nos micromovimentos celulares	59
2. Ensaio de atividade enzimática.....	67
2.1. Inibição da Elastase e da Colagenase.....	67
2.2. Inibição da Tirosinase	69
3. Novos derivados acilados de antocianinas	74
3.1. Caracterização dos derivados acilados por HPLC e LC-MS.....	74
3.2. Atividade Antioxidante	76
3.3. Atividade Antiproliferativa dos derivados acilados	77
Conclusão	81
Referências Bibliográficas	87

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura geral das principais classes de flavonóides

Figura 2. Estrutura das antocianidinas mais abundantes na natureza.

Figura 3. Espécies das antocianinas em equilíbrio químico em solução aquosa, R1 e R2 = H, OH ou OMe (adaptado de Mazza et al. 1992).

Figura 4. Representação esquemática das camadas da pele e respetivos constituintes de cada camada (adaptado de *Anatomy and Physiology* – OpenStax).

Figura 5. Papel do stress oxidativo no envelhecimento e em resposta à exposição solar. O aumento de produção de ROS (stress oxidativo), leva à alteração da expressão génica assim como das vias de sinalização. O ataque por parte de ROS a proteínas e lípidos provoca alteração de estrutura e, frequentemente, de função. Isto provoca alterações à homeostasia da pele, modificando o comportamento celular e as interações célula-matriz, o que leva à alteração da função do órgão (adaptado de *Callagan et al.*, 2008).

Figura 6. Hiperpigmentação. Manchas irregulares de melanina dispersas aleatoriamente na pele, normalmente associadas ao envelhecimento, tendo como causa principal a sobre-exposição solar. Adaptado de bellairlaserclinic.ca.

Figura 7. Imagem histológica elucidando as zonas da epiderme, caracterizadas pela migração e alteração de função dos queratinócitos, desde o *Stratum basale* até ao *Stratum corneum* (adaptado de *Junqueira's Basic Histology – Text and Atlas*).

Figura 8. Matriz de oito poços, cada com um eléctrodo de trabalho de 250 µm de diâmetro (8W1E). Dependendo do tipo celular o eléctrodo registará o comportamento de 50-100 células.

Figura 9. Modelo aplicado ao ECIS, válido para células em confluência. R_b – resistência de barreira (parâmetro paracelular); α – variação de impedância abaixo das células (relação entre células e matriz); C_m – capacitância de membrana; h – distância entre as células e o eléctrodo; r_c – raio da célula (adaptado de *Applied Biophysics*).

Figura 10. Monitorização do consumo de oxigénio na presença e na ausência de antioxidantes.

Figura 11. Cromatogramas representativos das análises por HPLC das antocianinas isoladas a partir de um extrato de vinho (A) e da antocianina maioritária, Mv3glc (C), assim como do extrato antociânico de amora (B) e da antocianina maioritária, Cy3glc (D) isolada a partir desse extrato. 1) Dp3glc: delphinidina-3-O-glucósido; 2) Pt3glc: petunidina-3-O-

glucósido 3) Pn3glc: peonidina-3-O-glucósido; 4) Mv3glc: malvidina-3-O-glucósido; 5) Cy3glc: Cianidina-3-O-glucósido; 6) Cy3rut: Cianidina-3-rutinósido, 7) Cy3dioxaglc: Cianidina-3-dioxaloyl-glucósido e 8) Cy3manglc: Cianidina-3-malonyl-glucósido.

Figura 12. Estruturas químicas dos pigmentos antociânicos identificados nos extratos de vinho tinto e de amora.

Figura 13. Efeito dos extratos antociânicos e das antocianinas purificadas mv3glc e cy3glc na proliferação de células HaCat, avaliado por ensaio de SRB. As células foram inoculadas em placas de 96 poços e tratadas com uma gama de concentrações de cada composto (6,25 – 100,0 μ M), por 48 horas. Cada valor representa a média \pm SEM (n = 6) ***p < 0,001 (diminuição significativa relativamente ao controlo).

Figure 14. Representações de uma matriz de oito poços do tipo 8W1E PET A) inoculado com uma densidade celular de $1,6 \times 10^5$ células/ml ou B) $1,6 \times 10^6$ células/ml, em meio DMEM-F12. Os valores de resistência foram medidos a 4 kHz e normalizados tendo em conta os valores basais dos elétrodos ($R_n - R_0$).

Figura 15. Representação gráfica exemplificativa para um poço dos valores de capacitância, registados a uma frequência de 64 kHz, quando células HaCat são inoculadas a uma densidade celular de $1,6 \times 10^6$ cel/mL. Calcularam-se dois parâmetros com base nestes resultados, de modo a caracterizar a adesão e proliferação dos queratinócitos nos microelétrodos revestidos de gelatina. $T_{1/2}$ refere-se ao tempo necessário para que os valores de capacitância sejam metade do valor máximo inicial. A taxa de proliferação também foi calculada, como o declive da regressão linear aplicada entre C = 1,0 e 6,0 nF. Estes parâmetros foram calculados tendo por base resultados de oito poços independentes e são apresentados como a média \pm SEM (n = 8).

Figura 16. Gráfico log-log dos valores de resistência A) e de capacitância B) medidos em função da frequência de elétrodos livres de células e com culturas confluentes.

Figura 17. Resultados obtidos para o controlo negativo realizado com DMSO por foram a validar os ensaios de citotoxicidade. Os valores de resistência foram normalizados ao valor de resistência imediatamente anterior à aplicação das diferentes concentrações do solvente ($\frac{R_n}{R_0}$). Testaram-se quatro concentrações (0,01, 1, 5 e 10% de DMSO em DMEM-F12), por incubação de uma monocamada de células HaCat durante 24 horas.

Figura 18. Representação gráfica dos valores normalizados de resistência $\left(\frac{R_n}{R_{\text{poço sem células}}}\right)$ em função do Log (frequência), obtido 24 horas após a adição das soluções de diferentes concentrações de DMSO.

Figura 19. Imagens de microscopia de campo claro da cultura de células HaCat em elétrodos do sistema ECIS após incubação com soluções de diferentes concentrações DMSO (0, 1, 5 e 10%).

Figura 20. Representação gráfica exemplificativa de ensaios de citotoxicidade em ECIS para os extratos antociânicos de vinho tinto e de amora, assim como as antocianinas isoladas Mv3glc e Cy3glc. Os valores de resistência estão normalizados ao valor de resistência imediatamente anterior à adição dos compostos $\left(\frac{R_n}{R_0}\right)$.

Figura 21. Valores de resistência normalizados $\left(\frac{R_n}{R_{média}}\right)$ e obtidos após 24 horas de incubação de células HaCat com os compostos ou apenas com meio de cultura (controlo).

Figura 22. Transformada de Fourier aplicada a leituras de resistência a 4 kHz de uma monocamada de células HaCat expostas a diferentes fontes antociânicas (extratos de vinho tinto e de amora, e antocianinas isoladas Mv3glc e Cy3glc) a uma concentração de 20 µM. Cada curva consiste num conjunto de 2048 pontos medido a intervalos de um segundo.

Figura 23. Análise da variância **(A)** e da variância de incrementos **(B)** dos valores de resistências medidos para células HaCat em monocamada quando expostas a diversas fontes antociânicas (extratos de vinho tinto e de amora, e antocianinas isoladas mv3glc e cy3glc) a uma concentração de 20 µM. Cada curva consiste num conjunto de 2048 pontos medidos a intervalos de um segundo.

Figura 24. Ensaios de *wound-healing* em tempo-real com células HaCat utilizando o sistema ECIS. **A)** Representação dos valores de resistência após indução do dano elétrico em resposta à incubação com os extratos de antocianinas de vinho e amora, assim como às antocianinas isoladas mv3glc e cy3glc, para uma concentração de 20 µM. **B)** Representação gráfica das diferenças em resistência a diferentes tempos após o dano. Cada valor representa a média ± SEM (n= 4-5) *p < 0,05, ** p < 0,001 (aumento significativo vs controlo).

Figura 25. Ensaio de *wound-healing* com células HaCat realizado com o sistema ECIS. **A)** Representação gráfica dos valores de capacitância em função do tempo, a partir do momento em que o dano foi induzido (tempo 0 horas) em resposta à incubação com extratos antociânicos de vinho tinto e de amora, assim como de antocianinas isoladas, Mv3glc e Cy3glc, para uma concentração de 20 µM. **B)** Tempo necessário para que as células recuperam 50% do dano, na presença de meio de cultura DMEM-F12 (controlo) ou na presença dos compostos antociânicos. Cada valor representa a média ± SEM (n= 4-5) *p < 0,05, ** p < 0,01 (decréscimo significativo vs controlo).

Figura 26. Percentagem de inibição da atividade enzimática da elastase e da collagenase de dois extratos antociânicos de vinho e de amora e dos seus pigmentos maioritários, mv3glc e cy3glc, respetivamente. Os valores representam a média \pm SEM (n=3), *p < 0,05, ***p < 0,001 (diferente do controlo).

Figura 27. Percentagem de inibição da atividade enzimática da tirosinase de dois extratos antociânicos de vinho e de amora e dos seus pigmentos maioritários, mv3glc e cy3glc, respetivamente. Os valores representam a média \pm SEM (n=3), ***p < 0,001 (diferente do controlo).

Figura 28. Efeito dos extratos antociânicos de vinho e de amora e dos pigmentos mv3glc e cy3glc na atividade da tirosinase. **A)** Representação dos resultados segundo o modelo de Michaelis-Menten e **B)** representadação de Lineweaver-Burk. ($R^2 > 0,98$; n=3).

Figura 29. Esquema reacional da esterificação da Mv3glc com diversos ácidos gordos, por via enzimática catalizada pela lipase B de *C. Antarctica*.

Figura 30. Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC-DAD dos produtos das diferentes reações enzimáticas de esterificação da mv3glc, obtidos ao comprimento de onda máximo e representativos da conversão máxima para cada derivado acilado.

Figura 31. Inibição da oxidação de lipossomas iniciada por AAPH, por medição do consumo de oxigénio para uma concentração de 100 μ M de Mv3glc e dos seus derivados acilados. As colunas representam a média \pm desvio padrão. Colunas com a mesma letra não diferem entre si estatisticamente (*p < 0,05).

Figura 32. Efeito dos derivados acilados de mv3glc na proliferação de células HaCat, avaliado por ensaio de SRB. As células foram inoculadas em placas de 96 poços e tratadas com uma gama de concentrações de cada composto (6,25 – 100,0 μ M), por 48 horas. Cada valor representa a média \pm SEM (n=6) *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (diminuição significativa relativamente ao controlo).

Lista de Tabelas

Tabela 1. Concentração em antocianinas de diversas fontes alimentares, como frutos e vegetais.

Tabela 2. As camadas da pele.

Tabela 3. Valores basais de resistência e capacitância para oito poços de um array 8W1E, após tratamento com cisteína.

Tabela 4. Identificação estrutural por HPLC-MS das antocianinas presentes nos extratos de vinho e de amora.

Tabela 5. Pâmetros do modelo de ECIS calculados para uma monocamada de células HaCat, após 24 horas de incubação com DMSO. Foram apenas obtidos valores para as concentrações de 0.01 e 1%, já que as mais elevadas causaram danos à monocamada, inviabilizando a aplicação do modelo.

Tabela 6. Parâmetros calculados a partir do modelo do sistema ECIS para uma monocamada de células HaCat, 24 horas após incubarem com os extratos e com os pigmentos antociânicos isolados, a uma concentração de 20 μ M. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 7. Análise dos resultados dos ensaios de micromovimentos realizados com uma monocamada de células HaCat 24 horas após incubação com os extratos antociânicos e as suas antocianinas maioritárias a uma concentração de 20 μ M. A coluna de 'Resistência' representa a média dos valores de resistência ao longo da medição de 2048 pontos. A coluna referente ao 'Power Slope' é o declive da regressão linear dos mínimos quadrados do gráfico log-log do espectro de potências. A coluna Var32 é a variância estatística para os valores representantes dos intervalos de 32 pontos. A coluna VOi32 refere-se à variância de incrementos para os intervalos de 32 pontos do conjunto de 2048-s. A coluna dos valores de Hurst diz respeito ao expoente de Hurst. Os valores são apresentados como a média \pm desvio padrão (n= 4-7 para cada composto).

Tabela 8. Parâmetros cinéticos calculados a partir da modelação de Michaelis-Menten para a reação catalisada pela tirosinase, na presença e na ausência de inibidores. K_m – constante de Michaelis-Menten; V_{max} – velocidade máxima da reação. Apresentam-se os valores da média \pm SEM e realizaram-se os ensaios em triplicado (n=3).

Tabela 9. Tempos de retenção na análise por HPLC HPLC e resultados obtidos na análise por massa da malvidina 3-glucósido, **1**, e dos seus derivados ésteres, **2-8**.

Lista de Abreviaturas

α – variação da impedância abaixo das células num eléctrodo d ECIS;

Abs - absorvância;

AC – corrente alternada;

ACN – acetonitrilo;

AAPH – hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-metilpropanimidamida);

API - pressão atmosférica de ionização;

C – capacitância (em nF);

C4 – ácido butírico;

C6 – ácido hexanóico;

C8 – ácido cáprico;

C10 – ácido decanóico;

C12 – ácido láurico;

C14 – ácido mirístico;

C16 – ácido palmítico;

ChC – colagenase de *Clostridium histolyticum*;

Cm – capacitância de membrana ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$);

Cy – cianidina;

Cy3glc – cianidina-3-glucósido;

Cy3rut – cianidina-3-rutinósido;

Cy3dioxaglc – cianidina-3-dioxaloil-glucósido;

Cy3manglc – cianidina-3-malonil-glucósido;

DC – corrente contínua;

DMSO – dimetilsulfóxido;

Dp – delfinidina;

Dp3glc – delfinidina-3-glucósido;

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrozil;

ECIS – *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing*;

ESI – ionização por electrospray;

FALPGA - N-[3-(2-Furil)acrilolil]-Leu-Gly-Pro-Ala;

FFT – transformada de Fourier;

FRAP – *ferric reducing antioxidant power*;

h – distância entre células e o eléctrodo em ECIS;

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência;

I – corrente elétrica (em amperes);

K_m – constante de Michaelis-Menten;

LC-MS – cromatografia líquida com espectrómetro de massa;

L-DOPA – Ácido (S)-2-amino-3-(3,4-diidróxifenil) propanóico - substrato da tirosinase;

MeOH – metanol;

mM – milimolar;

MM – massa molar;

MMPs - metaloproteinases;

MMP-1 – collagenase;

Mv - malvidina;

Mv3glc – malvidina-3-glucósido;

Mv3glc-C4 – malvidina-3-glucósido-ácido butírico;

Mv3glc-C6 - malvidina-3-glucósido-ácido hexanóico;

Mv3glc-C8 - malvidina-3-glucósido-ácido cáprico;

Mv3glc-C10 - malvidina-3-glucósido-ácido decanóico;

Mv3glc-C12 - malvidina-3-glucósido-ácido láurico;

Mv3glc-C14 – malvidina-3-glucósido-ácido mirístico;

Mv3glc-C16 - malvidina-3-glucósido-ácido palmítico;

PBS – tampão fosfato;

Pg – pelargonidina;

Pn – peonidina;

Pn3glc – peonidina-3-glucósido;

PPE – elastase pancreática;

Pt – petunidina;

Pt3glc – petunidina-3-glucósido;

R – resistência (em ohms - Ω);

R_b – resistência de barreira (em Ωcm^2);

r_c – raio da célula;

ROS – espécies reativas de oxigénio;

RTC - *rapid time collect*;

SBF – Soro bovino fetal;

SRB – Sulfurodamida B;

TCA – ácido tricloroacético;

UV – ultravioleta;

V – voltagem (em volts);

V_{max} – velocidade máxima da reação enzimática;

X_c – reactância;

Z – impedância (em ohms - Ω);

Z_n (v) – impedância do eletrodo livre de células;

Z_m (v) – impedância do eletrodo coberto de células;

λ – comprimento de onda;

μL – microlitros;

μM – micromolar;

Introdução

1. Polifenóis

Os polifenóis constituem uma família numerosa de compostos distribuídos abundantemente na natureza e em resultado do metabolismo secundário das plantas. Estes desempenham diferentes papéis importantes, na coloração e maturação dos frutos, na proteção contra a radiação UV e contra agentes agressores, tais como bactérias e insetos, no desenvolvimento de características organoléticas e sensoriais (sabor, cor e adstringência), e ainda atuando como antioxidantes contra radicais livres gerados no processo de fotossíntese [1-3]. Desta forma, as propriedades que os polifenóis conferem às plantas e que servem não só para defesa, mas também para atração de polinizadores, tem levado a uma extensa investigação em torno destes metabolitos, na expectativa de se encontrarem produtos com valor para a saúde humana.

Hoje em dia, é comum associar-se uma dieta mediterrânea, rica em frutos e legumes e na qual o consumo do vinho e azeite é recorrente, à prevenção de patologias como as doenças cardiovasculares [4] e neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson), e outras como o cancro [5-7]. Um exemplo recorrente desta associação é o Paradoxo Francês, no qual é postulado que determinada população de uma região francesa apresentaria uma incidência reduzida de doença coronária, ainda que o consumo de gorduras saturadas e os hábitos tabágicos fossem comuns. Esta reduzida incidência foi atribuída ao consumo moderado e regular de vinho tinto [8] e, em estudos mais recentes, tem-se atribuído aos polifenóis do vinho tinto propriedades de prevenção na formação das placas ateroscleróticas [9]. A relação entre a prevenção das patologias referidas e os polifenóis é normalmente feita considerando a capacidade desses compostos de contrariar o stress oxidativo associado a essas doenças [10-12]. Ainda assim, deve-se ter em conta que a atividade antioxidante não será a única atividade biológica importante para a ação dos polifenóis [13, 14]. Deve-se considerar que alguns antioxidantes podem também atuar como pró-oxidantes sob determinadas condições e que, desta forma, se deve balançar o uso destes compostos e o fim para o qual são usados. Por exemplo, o uso de polifenóis como suplementos alimentares compostos por elevadas doses de um único antioxidante poderá ter efeitos nefastos para a saúde. Ao contrário, a suplementação com múltiplos antioxidantes com diferentes propriedades poderá reduzir o risco de incidência do dano e minimizar alguma toxicidade associada [15].

Os estudos biológicos que pretendem investigar a relevância destes compostos na saúde humana têm ainda de considerar a composição bioquímica dos componentes da matriz em que os compostos são aplicados, para além da sua biodisponibilidade. Isto porque, ainda que as atividades biológicas dos polifenóis sejam muitas vezes demonstradas *in vitro*, é sempre preciso ter em consideração a extensão da sua absorção

pelo organismo e subsequente metabolização, identificando os metabolitos e testando a sua bioatividade, que pode ou não corresponder à do seu precursor. Assim, e para além do seu interesse como nutrientes essenciais, os polifenóis têm sido também utilizados na indústria alimentar e na indústria cosmética, podendo ser utilizados como substitutos de antioxidantes ou de corantes sintéticos [16].

2. Flavonóides

O termo fenol ou polifenol descreve compostos que possuem um anel benzénico substituído por um ou mais grupos hidroxilo (-OH). Os polifenóis estão divididos em pelo menos 10 classes com base na sua estrutura química [17], sendo que o mais representativo é o grupo dos flavonóides, que se divide em diversas subclasses (Figura 1).

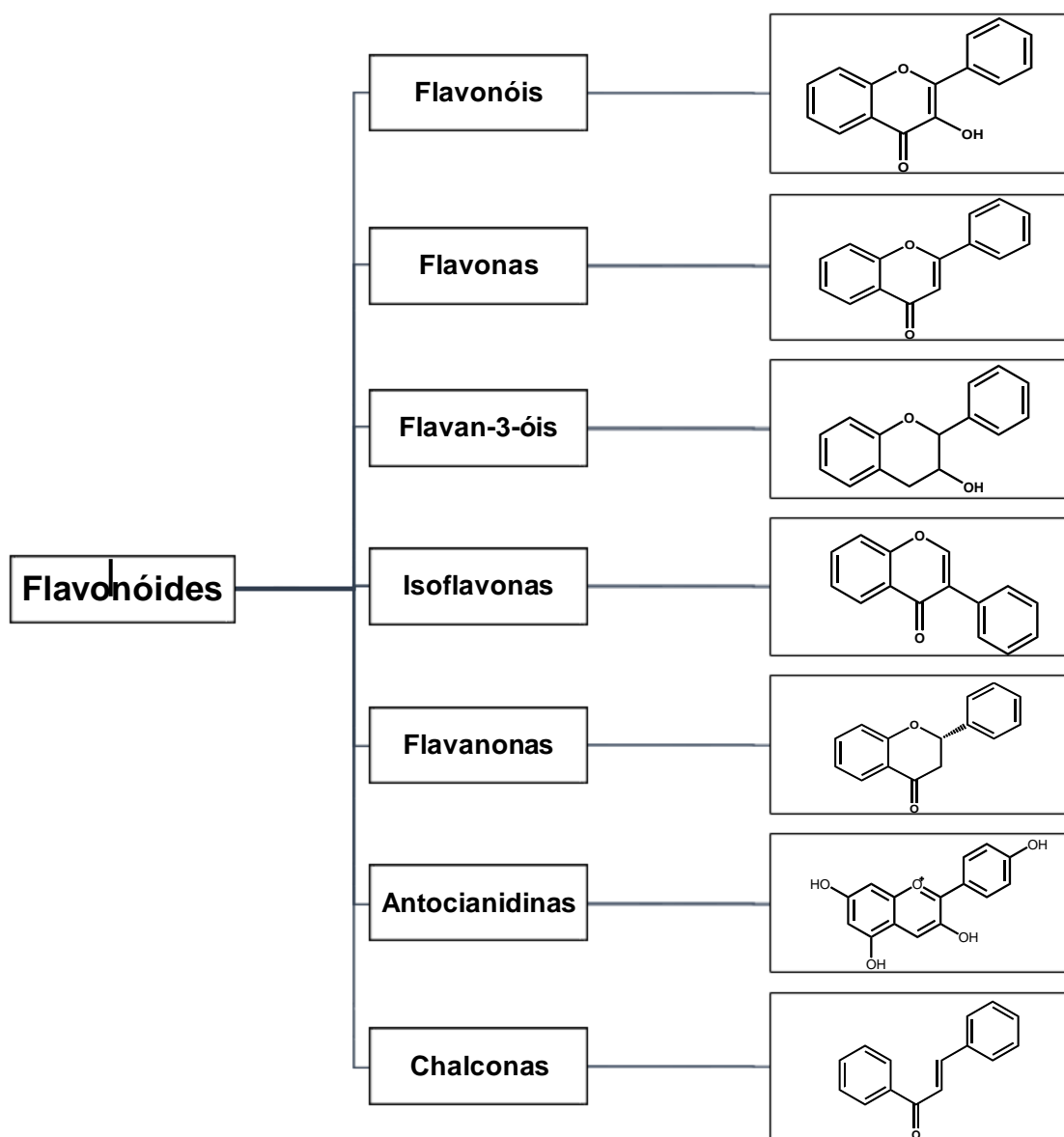


Figura 1. Estrutura geral das principais classes de flavonóides.

Esta classe de polifenóis é caracterizada estruturalmente por um núcleo flavânico: C6-C3-C6, constituída por dois anéis aromáticos ligados por um anel heterocíclico. Encontram-se, frequentemente ligados a açúcares, o que os torna solúveis em água, ainda que também ocorram, ocasionalmente, nas plantas na forma aglicona. Os diferentes compostos distinguem-se entre eles pelo padrão de hidroxilação e metilação dos anéis A e B e pela natureza e posição dos açúcares dos respetivos glicósidos, sendo que os açúcares mais comuns são a glucose e a ramnose, podendo também ser a galactose, a xilose, a arabinose, entre outros.

3. Antocianinas

3.1. Propriedades Químicas e Estruturais

As antocianinas (do grego *anthos*, que quer dizer flor, e *kianos*, que significa azul) são uma classe de pigmentos solúveis em água e os mais importantes entre os visíveis ao olho humano [18]. Pertencentes à família dos flavonóides, as antocianinas são metabolitos secundários das plantas que têm um papel importante na atração dos insetos e na polinização ou dispersão de sementes, sendo responsáveis pelas cores ciânicas, desde o salmão ao vermelho, e do violeta ao azul-escuro da maioria dos frutos, vegetais e flores das angiospérmicas [19, 20]. Por outro lado, podem ainda estar envolvidas na proteção contra a radiação ultravioleta [3]. Estruturalmente, as antocianinas são produtos de glicosilação do catião flavílio polihidroxilado e polimetoxilado [21], sendo assim constituídas por uma estrutura aglicona - a antocianidina – um derivado oxigenado do 2-fenilbenzopirílio (isto é, do catião flavílio) contendo dois anéis benzénicos (A e B) separados por um anel heterocíclico (C), ou seja, um esqueleto C6-C3-C6. Ainda que ao longo dos anos se tenham identificado 18 antocianidinas naturais, apenas seis são mais frequentemente encontradas na natureza, sendo estas: cianidina (Cy), pelargonidina (Pg), delphinidina (Dp), peonidina (Pn), petunidina (Pt) e malvidina (Mv) [22] (Figura 2). Estes compostos apresentam cores intensas quando em condições acídicas devido ao longo cromóforo formado por oito ligações duplas conjugadas com carga positiva. O comprimento de absorção máximo na região do visível está compreendido entre os 465 e os 550 nm, enquanto que o outro máximo de absorção se situa na zona do UV entre os 270 e os 280 nm.

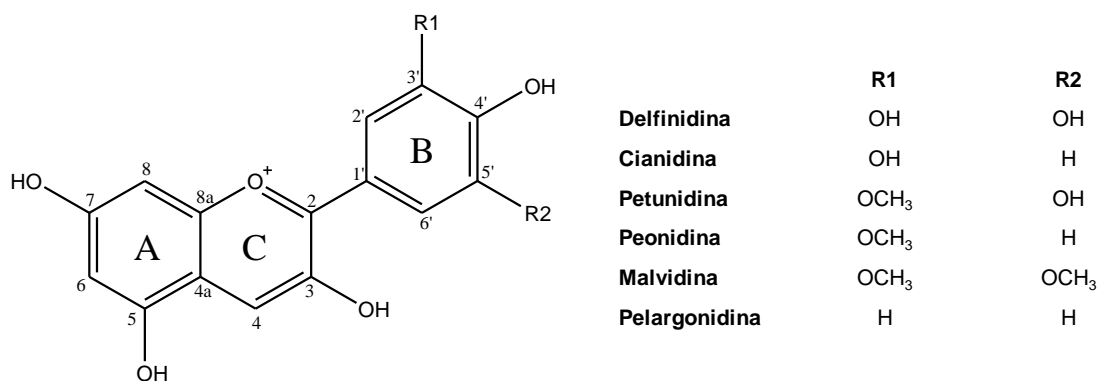


Figura 2. Estrutura das antocianidinas mais abundantes na natureza.

As substituições que geralmente ocorrem nas posições R1 e R2 do anel B são grupos hidroxilo ou metilo, responsáveis pelas pequenas diferenças na cor e nas propriedades físicas destes flavonóides [22]. Como acima se referiu, as antocianinas são derivados glicosídeos da estrutura aglicona, sendo que esta glicosilação pode ocorrer com uma variedade de mono-, di- e trisacáridos, comumente na posição C3, do anel C [23], sendo que as mais abundantes são 3-glicósido e 3,5-diglicósido. A glicosilação confere uma maior estabilidade e aumenta a solubilidade dos compostos. Estes substituintes são normalmente acilados, quer por ácidos alifáticos como são exemplo o ácido malónico, acético, málico, succínico e oxálico, quer por ácidos aromáticos, como o ácido *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sináptico, gálhico ou *p*-hidroxibenzóico [24]. A esterificação com ácidos orgânicos induz resistência ao calor, à luz, ao dióxido de enxofre e ao pH elevado, melhorando a estabilidade dos pigmentos e aumentando a qualidade da cor [25, 26].

A estabilidade das antocianinas é um ponto essencial quer no que diz respeito à sua biodisponibilidade, quer no que se refere à sua aplicação em matrizes alimentares e cosméticas, sendo um ponto crítico para o seu armazenamento. De facto, estes flavonóides são moléculas muito reativas e a sua estabilidade é afetada por uma série de fatores, tais como o oxigénio, as altas temperaturas, a luz e, principalmente, o pH [27, 28], sendo característica destes compostos a ocorrência de uma série de equilíbrios químicos entre espécies em solução. Equilíbrios esses que se relacionam diretamente com a cor [29]. Este fenómeno é explicado em detalhe na secção 3.3., ainda assim, de uma forma geral, quando em soluções de pH superior a 3.5, as antocianinas apresentam pouca expressão das suas cores ciânicas típicas encontradas na natureza, enquanto que a baixo desse valor apresentam cores vermelhas vibrantes [30]. Por outro lado, quando aquecidas apresentam-se descoradas, como resultado do deslocamento do equilíbrio para a estrutura de carbinol e de chalcona. Há, por isso, um interesse crescente pela compreensão dos mecanismos de absorção e de metabolismo destes compostos, por

forma a entender quais as espécies relevantes a atuar no organismo e quais as suas atividades biológicas, sendo que estas podem divergir daquelas dos precursores encontrados na dieta.

3.2. Ocorrência das Antocianinas

As antocianinas podem ser encontradas em todas as partes das plantas, ainda que existam maioritariamente nas flores e nos frutos [31-33] (Tabela 1). O conteúdo em antocianinas varia entre frutos do mesmo tipo, o que é explicado por diferenças no ambiente de cultura, nos fatores genéticos, nos modos de cultivo e na preparação e extração destes compostos [34]. Ainda que o conteúdo nestes compostos varie extensamente dependendo do produto alimentar, o perfil das antocianinas é característico de cada alimento sendo muitas vezes usado para a sua identificação [35]. As três antocianidinas não-metiladas (Cy, Dp, Pg) são as mais abundantes na natureza, sendo que a cianidina ocorre em 90 % dos frutos. Considerando que as antocianinas-3-glucósido são as mais abundantes, a cianidina-3-glucósido (cy3glc) é a mais difundida na natureza [36].

Tabela 1. Concentração em antocianinas de diversas fontes alimentares, como frutos e vegetais. (Adaptado de [37].)

Origem	Concentração em antocianinas (mg/kg)
Mirtilos	4600
Amora	820-1800
Cereja	3500-4500
Groselha	460-2000
Uvas tintas	400-7500
Ameixa	20-250
Framboesa vermelha	100-600
Framboesa preta	1700-4277
Morango	150-350
Beterraba	150-450
Rabanete	110-600
Vinho Tinto	240-350
Vinho do Porto	140-1100

Enquanto que alguns alimentos possuem um número limitado de antocianinas, outros podem conter uma mistura de mais de vinte [37]. Desta maneira, e tendo em conta a ocorrência amplamente difundida destes polifenóis nas plantas, assume-se que estes compostos são parte integrante da dieta, sendo que o seu consumo diário é

potencialmente o maior entre a classe dos flavonóides (> 100 mg/dia por pessoa de antocianinas e > 23 mg/dia por pessoa de outros flavonóides) [4, 38].

3.3. Influência do pH

Ao contrário do que acontece com outros membros da família dos flavonóides que possuem a mesma estrutura C6-C3-C6, as antocianinas têm carga positiva quando a pH ácido, sendo que, em solução, se encontram em equilíbrio entre quatro estruturas moleculares essenciais, sempre dependentes do pH: o catião flavílio (cor vermelha), a pseudobase carbinol (hemicetal, incolor), a base quinoidal (cor azul) e a chalcona (cor amarela) [39]. A percentagem relativa de cada uma destas formas varia com o pH e com a estrutura das antocianinas [40], sendo que a pH inferior a 1, a forma maioritária é a de catião flavílio. À medida que o pH aumenta, ocorre hidratação do catião flavílio, por ataque nucleofílico da água, originando, assim, a base carbinol. A partir do pH 2 começam a surgir as formas de chalconas, sendo que a proporção em catião diminui e a cor perde-se. A pH 4 a forma dominante é de carbinol, incolor, e à medida que o pH aumenta, para pH neutro e depois alcalino, a forma predominante é a de base quinoidal (Figura 3).

A estabilidade das antocianinas parece estar correlacionada com a distribuição dos compostos pelas suas formas secundárias, tendo sido sugerido que a formação do hemicetal é o passo mais crítico na estabilidade destes compostos. Sob condições acídicas e à temperatura ambiente, a forma de catião flavílio predomina e as antocianinas mantêm-se estáveis durante várias semanas. Contudo, sob condições neutras, verificou-se que para a malvidina-3-glucósido (mv3glc), quando dissolvida em solução aquosa, com pH 6-6,5, após 1 h a cor já era fraca, e após 1 dia de armazenamento, já não se detetava cor. A abertura do anel C do catião flavílio ocorre por hidratação na posição 2, formando assim a forma de hemicetal e, subsequentemente, a forma de chalcona, sendo este o primeiro passo postulado da degradação das antocianinas [28]. Desta forma, as antocianinas são estabilizadas por substituições na posição C4, já que essas substituições impedem o ataque nucleófilo da água e, portanto, a formação de espécies incolores.

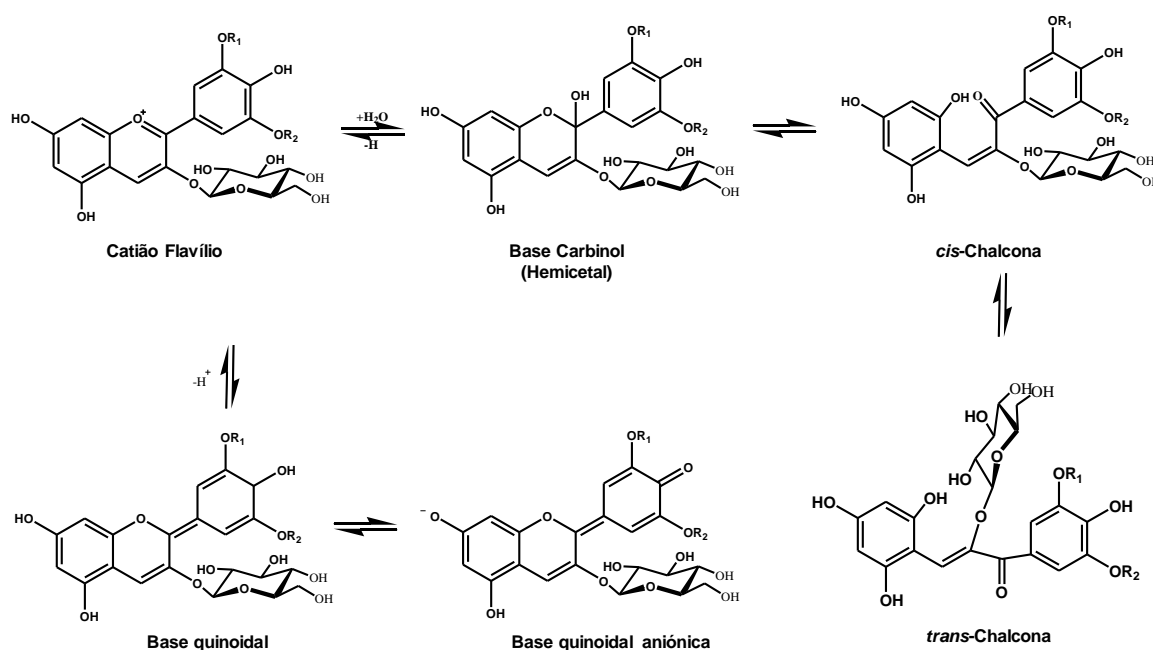


Figura 3. Espécies das antocianinas em equilíbrio químico em solução aquosa, R1 e R2 = H, OH ou OMe (adaptado de Mazza et al. 1992).

3.4. Toxicidade

Como resultado do consumo habitual de antocianinas por animais e humanos e na ausência de efeitos adversos provenientes desse consumo, estes compostos são considerados não tóxicos [41]. Foram realizados estudos com ratinhos, ratos e cães por forma a testar a tolerância dos animais à sua ingestão e verificou-se que a ingestão de um extrato de bagas de *V. myrtilus* (com um conteúdo de 36% em antocianinas), em doses superiores a 2000 mg/kg de peso corporal, não causou sintomas adversos. Para além disto, a ingestão diária de uma dose de 125 -150 mg/ kg ou 80-320 mg/kg de peso corporal em ratos e cães, respetivamente, durante seis meses também não provocou qualquer efeito adverso [42]. O uso de antocianinas naturais em alimentos e bebidas está regulamentado dentro da Comunidade Europeia (E-163), no Japão e nos Estados Unidos, já que foi concluído pelas autoridades responsáveis, incluindo pela *World Health Organization* – *WHO*, que os extratos de antocianinas apresentam uma toxicidade muito baixa, considerando a capacidade de induzir mutações e efeitos no desenvolvimento embrionário.

3.5. Principais propriedades biológicas das antocianinas

Tem havido um interesse crescente na bioquímica e nos efeitos biológicos das antocianinas em resultado dos estudos que demonstram as atividades biológicas e potenciais efeitos terapêuticos [18, 43]. De facto, diversos estudos mostram que estes compostos fenólicos possuem um leque de atividades biológicas, entre elas atividade

antioxidante [44-48], anti-inflamatória [49-51] e anticarcinogénica [52-54], indução de apoptose [53] e efeitos neuroprotetores [55]. É de notar que a maior parte dos efeitos biológicos associados às antocianinas foram apenas demonstrados *in vitro*, faltando, assim, evidência *in vivo* com base em estudos em animais e humanos, sendo que estes efeitos são dependentes da biodisponibilidade das antocianinas.

3.5.1. Atividade Antioxidante

A oxidação é um dos mecanismos responsáveis por diversas doenças como são exemplo o cancro e as doenças cardiovasculares. Estudos têm demonstrado que os antioxidantes podem prevenir muitos dos processos oxidativos que contribuem para a causa dessas doenças [56]. Os flavonóides são conhecidos antioxidantes e as três características estruturais que determinam esse potencial são: o grupo dihidroxilado (catecol) do anel B, a ligação dupla C2-C3 em conjugação com um grupo 4-oxo e a presença adicional dos grupos hidroxilo nas posições C3 e C5 (Figura 3) [57].

As antocianinas têm sido referidas como potentes antioxidantes, e, em certas condições, até mais potentes que os antioxidantes tradicionais como α -tocoferol ou o-hidroxitolueno [47, 58]. A atividade antioxidante destes compostos tem sido relacionada com as suas características estruturais que promovem o sequestro de radicais livres, a quelatação de metais e a indução da expressão de certas enzimas antioxidantes [59, 60]. As antocianinas são carregadas positivamente quando se encontram a pH ácido, e possuem entre elas diferentes arranjos de grupos hidroxilo, assim como diferentes padrões de substituição no anel B que podem funcionar como doadores ou aceitadores de eletrões. Desta forma, estes flavonóides são doadores efetivos de hidrogénio e possuem, por isso, a capacidade de doar prótons a espécies reativas como é o caso dos radicais livres. É esta característica estrutural que permite às antocianinas funcionar como agentes protetores de dano oxidativo, possibilitando, por exemplo, a neutralização de espécies reativas de oxigénio (ROS) [61]. Contudo, esta capacidade antioxidante está intimamente ligada com a estrutura química da molécula e, sendo assim, o número de grupos hidroxilo, os padrões de metilação e hidroxilação, assim como a acilação das partes fenólicas do composto, relacionam-se com a capacidade de uma determinada antocianina ter uma melhor ou pior atividade antioxidante. De notar que a glicosilação mostrou diminuir a capacidade de sequestrar radicais, quando em comparação com a respetiva aglicona, já que há uma redução da capacidade do radical antociânico em deslocalizar eletrões [47].

Todavia, a validade destes ensaios *in vitro* tem de considerar a relevância biológica destes compostos, já que, estando a capacidade antioxidante relacionada com

a estrutura da molécula, é necessário ter em conta, não só o ambiente fisiológico em que estas moléculas se encontram no organismo (por exemplo, ao pH fisiológico de 7.4), mas também a metabolização que sofrem, sendo que os metabolitos formados podem apresentar poder antioxidante diferente daquele dos seus precursores. Para explorar a atividade dos compostos ou dos seus metabolitos têm sido realizados alguns ensaios clínicos. Foi, por exemplo, realizado um estudo com mulheres idosas que verificou a capacidade antioxidante do soro aumentada associada ao consumo de morangos ou vinho tinto [62]. Por outro lado, foi demonstrada a atividade antioxidante aumentada do soro de indivíduos do sexo masculino após o consumo de 1,2 g de antocianinas de mirtilo [45]. No entanto, o papel antioxidante destes polifenóis pode ser devido à sua ação enquanto modeladores da expressão génica, interferindo com vias de sinalização molecular diretamente ligadas ao stress oxidativo, ou ainda no seu papel protetor na promoção da expressão de enzimas antioxidantes, como é o caso da glutathione peroxidase, da superóxido dismutase ou da catalase [63-65]. Possíveis alvos da atividade das antocianinas sobre as vias envolvidas no stress-oxidativo são a regulação do fator de transcrição Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) [66, 67] e a regulação das MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), como verificado para a cianidina [68].

4. A pele

4.1. Estrutura e função

A pele é o maior órgão do corpo humano, perfazendo 16% do peso corporal com uma área superficial de 1.8 m². Este órgão possui diversas funções, sendo a mais importante a de barreira física contra o ambiente, permitindo a troca de água, eletrólitos e de outras substâncias ao mesmo tempo que protege o organismo contra micro-organismos, radiação ultravioleta, agentes tóxicos e danos mecânicos. A pele é constituída por três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 4, Tabela 2); e é um órgão dinâmico, sendo que as células das camadas mais exteriores são continuamente substituídas pelas células das camadas interiores que se movem para a superfície [69].

A epiderme é a camada mais exterior do órgão e serve de barreira física e química entre o interior do corpo e o ambiente exterior. Esta camada é um epitélio estratificado escamoso e relativamente fino. É sobretudo composta por queratinócitos, produtores de queratina. Estas células são originadas numa zona mais profunda da epiderme denominada de 'camada basal'. Novos queratinócitos migram lentamente para a superfície onde morrem e são substituídos por células migrantes da camada inferior.

Tendo em conta a complexidade da produção, migração e diferenciação destas células, a epiderme pode ser dividida em quatro partes: camada basal (zona de germinação das células), o estrato espinhoso, o estrato granuloso e o estrato córneo [70].

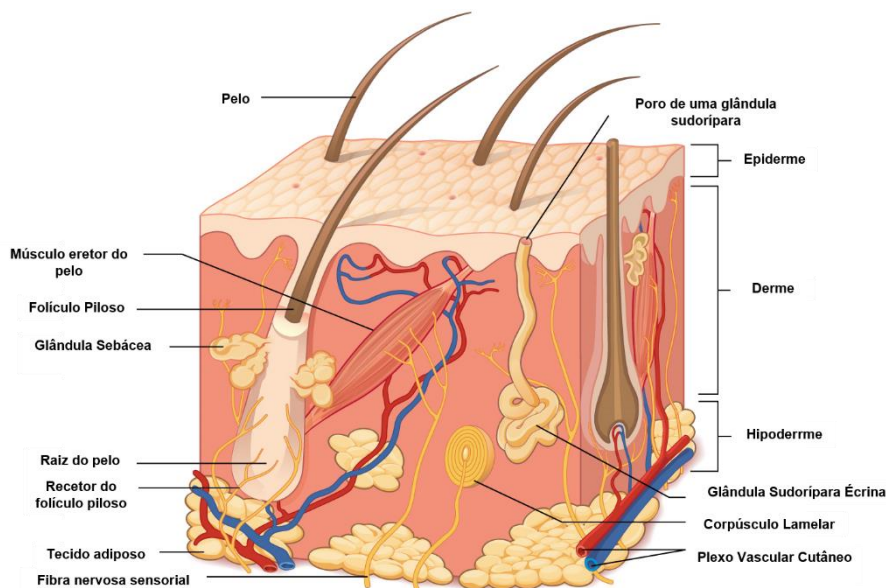


Figura 4. Representação esquemática das camadas da pele e respetivos constituintes de cada camada (adaptado de *Anatomy and Physiology – OpenStax*).

A parte mais superficial desta camada é hidrofóbica e, quando saudável, é capaz de impedir a entrada de bactérias, vírus e outras substâncias estranhas ao organismo, sendo que esta capacidade é sobretudo notada em zonas do organismo onde essa proteção é mais necessária, como sejam as palmas das mãos e dos pés, onde essa camada mais exterior (estrato córneo) é mais espessa. Na membrana basal, que separa a epiderme da derme, encontram-se melanócitos, células produtoras de melanina cuja principal atividade é a de absorção de radiação UV e, assim, de filtro protetor do órgão. Para além disto, a epiderme contém ainda células de Langerhans, que são células do sistema imunitário responsáveis pelo reconhecimento de agentes estranhos ao organismo e pelo desenvolvimento de alergias.

A derme é a camada que fornece suporte estrutural à pele, sendo composta por proteínas fibrosas como o colagénio e a elastina e conferindo à pele elasticidade e força. Estes componentes são sintetizados pelos fibroblastos, que são, então, células muito importantes da derme responsáveis pela manutenção da matriz extracelular que dá o suporte de tecido conetivo à pele e permitindo, assim, que os queratinócitos se fixem e possam formar a barreira mais externa do órgão. Note-se ainda que os fibroblastos estão envolvidos no processo de diferenciação dos queratinócitos através da libertação de fatores de crescimento, por exemplo. Para além disto, na derme encontra-se ainda uma rede de vasos sanguíneos, terminações nervosas, glândulas sebáceas e sudoríparas

poros e as raízes dos pelos. As terminações nervosas são responsáveis pela percepção da dor, toque, pressão e temperatura e estão distribuídas heterogeneamente pelo órgão, sendo que há áreas da pele com mais terminações que outras. As glândulas sudoríparas produzem suor como resposta ao calor e ao stress. Este é composto por água, sais e outras substâncias. A evaporação do suor permite um abaixamento da temperatura da pele. As glândulas sebáceas secretam uma substância oleosa nos folículos pilosos que ajuda a manter a humidade da pele e que age como barreira contra substâncias estranhas ao organismo. Por outro lado, os folículos pilosos possuem diferentes funções como a regulação da temperatura do corpo, sendo que aí se encontram células indiferenciadas capazes de se diferenciarem em células da epiderme no caso de dano. Os vasos sanguíneos presentes na derme fornecem nutrientes à pele e ajudam a regular a temperatura corporal, sendo que o calor provoca a dilatação dos vasos, de modo que mais sangue pode aí circular, e, assim, dispersar mais facilmente o calor e acontecendo o oposto no caso do frio, quando os vasos se constroem por forma a manterem a temperatura corporal [71].

A hipoderme é o tecido abaixo da derme composto por vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e, principalmente, tecido adiposo. Esta camada de gordura serve de local de armazenamento de energia e ajuda à manutenção da temperatura corporal, funcionando como isolante.

Tabela 2. As camadas da pele.

Camada da Pele	Descrição
Epiderme	Camada mais externa composta por queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans.
Membrana Basal	Estrutura que forma a ligação dermoepidermal.
Derme	Camada de tecido conetivo de suporte entre a epiderme e a hipoderme que contém glândulas sebáceas e sudoríparas, raízes do pelo, células nervosas, fibras, vasos sanguíneos e linfáticos e fibroblastos.
Hipoderme	A camada abaixo da derme composta por tecido conetivo e adiposo.

4.2. O envelhecimento da pele

Uma barreira de pele funcional e saudável é um importante protetor contra a desidratação, contra a penetração de vários microrganismos, alergénios, espécies reativas de oxigénio e contra a radiação UV. Assim, os cuidados diários que se podem ter com a pele podem melhorar a regeneração, a suavidade e a elasticidade da pele.

Contudo, e porque a pele está sujeita a tantos e tão diferentes agressores, o envelhecimento torna-se um fenómeno de interesse a estudar não só tendo em conta os processos naturais de envelhecimento, mas também a relação que a exposição a todos os agentes referidos tem com a aceleração desse processo. Assim, o envelhecimento da pele é um processo biológico complexo que resulta da conjugação de fatores endógenos, como a genética, o metabolismo celular, os processos hormonais e metabólicos, e fatores exógenos como a exposição à luz, à poluição, à radiação ionizante, e a certas toxinas [72-75]. A combinação destes fatores leva à acumulação de alterações fisiológicas e estruturais em cada camada de pele, assim como na aparência. Ainda que o envelhecimento seja um processo natural e inevitável, este está muitas vezes associado a condições patológicas, incluindo desordens degenerativas, e neoplasias benignas e malignas. Por isto, a investigação anti-envelhecimento tem substituído uma visão tradicional de envelhecimento como uma doença, e tem-se focado no bem-estar da pele para um envelhecimento saudável, minimizando os seus sinais no rosto e no corpo.

O envelhecimento da pele é caracterizado por uma flacidez, originado pela perda de elasticidade, de modo que uma pele envelhecida é caracterizada pelo aparecimento de enrugamentos (perda da elasticidade relacionada diretamente com os constituintes da matriz extracelular do órgão), por uma aspereza e descoloração que contrasta com uma pele fina e robusta não envelhecida, para além do aparecimento de manchas acastanhadas (acumulações heterogéneas de melanina). Além disso, ocorre um abrandamento da taxa de reciclagem da epiderme e da duração do ciclo celular o que origina um abrandamento no processo de cicatrização e uma menor descamação.

Os processos intrínsecos envolvidos no envelhecimento da pele são consequência das próprias alterações fisiológicas que acontecem ao longo do tempo e que são variáveis consoante a genética do indivíduo. Os fatores extrínsecos, por outro lado, são diversos e podem, até certo ponto, ser controlados. Estes são, por exemplo, a exposição à radiação solar e à poluição ambiente (como exposição à nicotina), ou ainda fatores como a dieta, a posição de dormir, entre outros relacionados com o estilo de vida de cada indivíduo [76]. A exposição à radiação ultravioleta tem vindo a ser indicada como a principal causa do envelhecimento precoce e envolvido em doenças como é caso mais grave do cancro da pele, sendo por isso denominado de *photoaging* [77, 78].

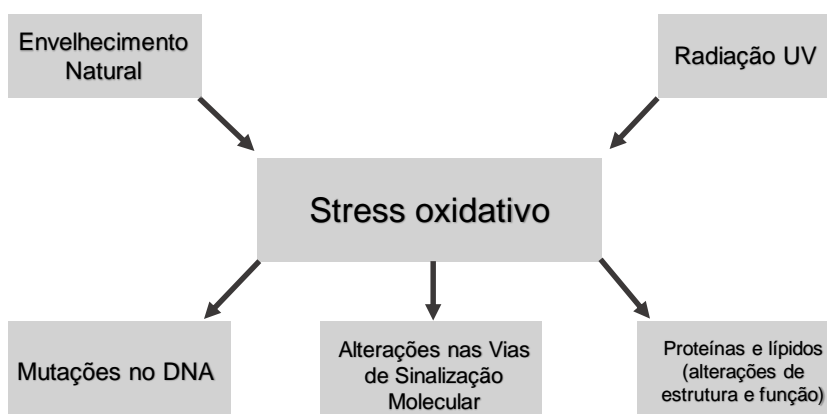


Figura 5. Papel do stress oxidativo no envelhecimento e em resposta à exposição solar. O aumento de produção de ROS (stress oxidativo), leva à alteração da expressão génica assim como das vias de sinalização. O ataque por parte de ROS a proteínas e lípidos provoca alteração de estrutura e, frequentemente, de função. Isto provoca alterações à homeostasia da pele, modificando o comportamento celular e as interações célula-matriz, o que leva à alteração da função do órgão (adaptado de Callagan *et al.*, 2008).

A principal marca histopatológica deste envelhecimento é uma acumulação excessiva de material elástico na derme, associado a alterações na elastina, o principal componente das fibras elásticas. Esta acumulação anormal de material elástico é acompanhada por uma degeneração da rede circundante de colagénio [79], em resultado do aumento da expressão de certas proteases que degradam este componente da matriz. O que acontece é que a exposição à radiação UV por cromóforos na pele desencadeia uma série de reações com formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) [80] que, em última estância, originam danos no DNA, assim como a modificação de proteínas e lípidos, resultando em alterações de função [81], para além de terem um papel essencial na iniciação e alteração de vias de sinalização em resposta à exposição a radiação UV (Figura 5).

4.3. Prevenção e tratamento do envelhecimento precoce

O organismo possui um sistema de antistress oxidativo, que inclui enzimas antioxidativas como a catálase, a superóxido dismutase e entre outras, assim como antioxidantes endógenos não enzimáticos, como é o caso da vitamina C e E e da glutathione [82]. Contudo, este é um sistema falível face a uma sobre-exposição solar. Uma pele envelhecida tem, como já se referiu, características histológicas bem definidas. Por um lado, a derme aparece preenchida por uma massa amorfa de fibras elásticas e de colagénio. Por outro lado, os glicosaminoglicados são mais proeminentes e os vasos sanguíneos aparecem dilatados e tortuosos. Os melanócitos, por seu turno, são irregulares, concentrados em alguns locais e em menor número noutros. Este fenómeno origina, por isso, características esteticamente indesejáveis e que ocorrem principalmente

devido à formação de ROS e consequente falha do sistema endógeno de defesa [83]. Estas espécies reativas são capazes de induzir a expressão de proteases responsáveis pela remodelação da matriz extracelular, como sejam as metaloproteinases (MMPs) e as proteases de serina. [84, 85]. A collagenase (MMP-1) é uma metaloproteinase capaz de clivar a ligação entre um aminoácido neutro (X) e a glicina, na sequência Pro-X-Gly-Pro, encontrado com frequência no colagénio. Esta protease tem a sua expressão aumentada quando o sistema é exposto à radiação UV e tem sido verificado que alguns polifenóis, como a catequina, possuem atividade anticollagenase [86]. Por outro lado, outro sistema proteolítico envolvido na manutenção da matriz é o sistema das proteases de serina, particularmente da elastase, que é um membro da família das quimiotripsinas responsável pela degradação da elastina. Tendo em conta as suas propriedades elásticas únicas, esta proteína é um dos componentes essenciais à manutenção da elasticidade da pele. Desta forma, a busca por inibidores destas proteases pode ser muito útil no que diz respeito à prevenção da perda de elasticidade e firmeza da pele [84].

Adicionalmente, têm sido também estudados compostos com possível efeito no aparecimento de manchas anormais de melanina, já que esta é também uma característica estética indesejável do envelhecimento. Este pigmento é sintetizado por uma série de reações cujo passo limitante é catalisado pela tirosinase, uma oxidase que contém cobre e que está distribuída largamente na natureza (em bactérias, fungos, plantas e animais). De facto, o processo de melanogénese é iniciado pela oxidação da L-tirosina em L-DOPA, que por sua vez origina dopaquinona e que, por sucessivas reações espontâneas origina o dopacromo e, por fim, a melanina. Quando a atividade da enzima é exacerbada, há ocorrência de hiperpigmentação (Figura 6), podendo ocorrer a formação de manchas irregulares na pele e, por isso, a investigação de possíveis inibidores desta enzima poderá ter interesse na prevenção e tratamento do aparecimento de manchas associadas ao envelhecimento.

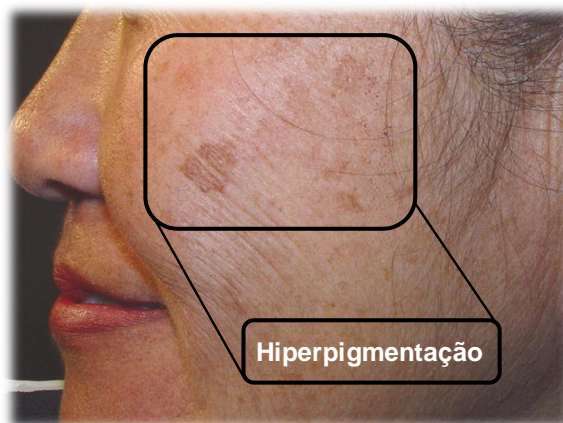


Figura 6. Hiperpigmentação. Manchas irregulares de melanina dispersas aleatoriamente na pele, normalmente associadas ao envelhecimento, tendo como causa principal a sobre-exposição solar. Adaptado de bellairlaserclinic.ca.

A investigação no campo do envelhecimento precoce, nomeadamente considerando os danos causados pela radiação UV tem sido crescente, especialmente no que diz respeito ao tratamento das suas marcas mais visíveis (rugos e manchas heterogêneas de melanina), mas tem-se cada vez mais dado atenção ao bem-estar diário da pele, à prevenção e consequente modulação dos danos da exposição à radiação solar. De facto, quando se pensa em proteção contra a radiação UV, pensa-se em protetores solares como primeira linha de combate e estes têm um papel muito importante na prevenção do envelhecimento precoce, já que, ao absorverem a radiação, impedem que esta seja absorvida pela pele e cause os efeitos nefastos já descritos. Contudo, ainda que haja cada vez mais consciência em relação ao bem-estar da pele e à prevenção contra a excessiva exposição solar, é difícil travar o envelhecimento precoce. Daí que surjam cada vez mais tratamentos auxiliares das consequências dessa exposição, como é o caso da prevenção de formação de rugas, conseguida através do impedimento da degradação dos constituintes estruturais primários ou que promovam a sua manutenção. É exemplo disto o uso de retinoides, capazes de inibir a colagenase e promover a síntese de colagénio. Por outro lado, outra estratégia de prevenção de enrugamentos da pele é a redução de fenómenos de inflamação, por aplicação tópica ou sistémica de antioxidantes, que podem inclusive ser utilizados conjuntamente com protetores solares. Estes compostos, enquanto suplementos nutricionais, podem atuar de diferentes formas: 1 – podem neutralizar diretamente os radicais livres; 2 – podem reduzir as concentrações de peróxido ou reparar membranas oxidadas; 3 – podem fazer o *quenching* de iões de ferro, diminuindo a produção de ROS; 4 – por via do metabolismo de lípidos, sendo que pequenos ácidos gordos e ésteres de colesterol neutralizam os ROS [87]. Os antioxidantes sistémicos mais conhecidos são a vitamina C, a vitamina E, os carotenoides, e componentes vestigiais como o cobre e o selénio. Na literatura, demonstrou-se ainda que o uso das vitaminas C e E na presença de um ácido fenólico, o ácido ferúlico, conjuga ao mesmo tempo um efeito de protetor solar e de antioxidante [88]. A vitamina E, por exemplo, está descrita como um componente de produtos para a pele, agindo como anti-inflamatório e antiproliferativo, em concentrações entre 2 e 20%, tendo a capacidade de manter a humidade do estrato córneo, acelerando a epitelização e contribuindo para a fotoproteção [89]. Outro estudo mostrou que o tratamento com polifenóis do chá verde antes da exposição à radiação UV leva a uma diminuição das células de Langerhans e reduz os danos do DNA na pele.

Assim, os agentes anti-envelhecimento podem funcionar principalmente por duas vias: como antioxidantes, tais como as vitaminas e os polifenóis, capazes de reduzir a degradação de colagénio, por redução da concentração de radicais livres, ou, por outro

lado como modeladores celulares, como é o caso dos retinoides, de certos péptidos e de fatores de crescimento, que têm um efeito direto no metabolismo do colagénio e que influenciam a sua produção. É, por isso, importante o estudo de novos agentes capazes de atuar no processo de envelhecimento da pele.

5. Antocianinas como potenciais ingredientes cosméticos

As antocianinas enquanto compostos naturais e constituintes da família dos polifenóis apresentam características químicas e biológicas relevantes para a indústria cosmética, como é o caso do seu poder antioxidante, mas também enquanto modeladores da ação de algumas enzimas essenciais ao normal funcionamento e estado do órgão, nomeadamente aquelas responsáveis pelos componentes da matriz extracelular: a colagenase e a elastase, e ainda considerando que em estudos com queratinócitos, foi demonstrado terem um papel protetor contra danos oxidativos [90]. Note-se ainda que, além de terem o seu uso regulamentado pelas autoridades de saúde e alimentação, há um interesse crescente da parte do consumidor pela utilização de compostos naturais nos consumíveis em geral, e particularmente nos produtos de higiene e beleza. Assim, a integração destes compostos em formulações cosméticas aparenta ter um interesse económico relevante, especialmente quando se alia a isto o facto de estes metabolitos secundário das plantas poderem ser obtidos a partir de subprodutos e de resíduos industriais, como é o caso da indústria produtora de vinho ou da indústria agrícola de produção de frutos vermelhos.

Para além do exposto, as antocianinas apresentam cor, uma característica que poderá ser uma mais-valia considerando o potencial uso em produtos de maquiagem (batons, sombras, entre outros), servindo de substitutos de pigmentos sintéticos e aliando a isso as suas propriedades biológicas para o bem-estar da pele. Um estudo demonstrou a capacidade fotoprotetora de um extrato de amora enriquecido em antocianinas [90], não só por redução das espécies reativas de oxigénio, mas também por indução da expressão de certas enzimas, como a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase. Outro estudo com antocianinas de feijão de soja preto mostrou que estas protegiam os queratinócitos da citotoxicidade causada pela exposição à radiação UV e reduziam a apoptose, prevenindo a ativação da via da capase-3 e redução da expressão da proteína proapoptótica Bax [91]. Relacionou-se ainda a potente atividade antioxidante da delphinidina com a sua capacidade de inibir o stress oxidativo gerado pela radiação UV em queratinócitos e em pele de ratinho [92].

A literatura sugere, então, que estes flavonóides poderão ser potenciais agentes contra os danos causados pela exposição à radiação UV, já que estes podem atuar como

antioxidantes e modeladores das vias de sinalização. No entanto, a pele enquanto órgão complexo constituído por diferentes camadas celulares com diferentes funções poderá servir-se de outras propriedades biológicas destes polifenóis para melhorar o seu funcionamento. De facto, o envelhecimento da pele torna este órgão menos funcional no que diz respeito, por exemplo, à regeneração celular [93]. Esta dificuldade em regenerar prende-se não só com a dificuldade em sintetizar novos componentes da matriz, mas também com o abrandamento do ciclo celular. Ainda que o epitélio seja composto por diferentes tipos de células, as mais abundantes são os queratinócitos. Estes surgem na camada basal da epiderme e migram à superfície, sendo que algumas se mantêm como células estaminais nessa zona. Durante a migração, os queratinócitos sofrem alteração na sua morfologia e bioquímica, com o aparecimento de desmossomas na camada *Stratum spinosum*, e iniciando a síntese de fatores estruturais como a queratina e a involucrina, dependentes da ação da transglutaminase, uma enzima dependente do cálcio e que catalisa a formação de ligações peptídicas intermoleculares. Estas proteínas são componentes essenciais na formação do *Stratum corneum*, que consiste maioritariamente em filamentos de queratina unidos por pontes bissulfito (Figura 7) [94].

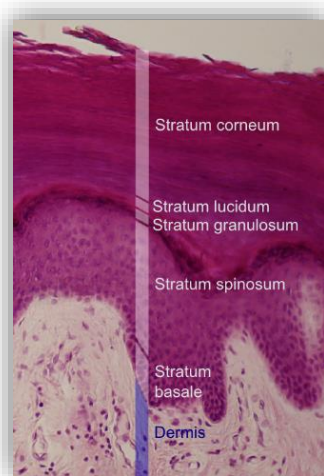


Figura 7. Imagem histológica elucidando as zonas da epiderme, caracterizadas pela migração e alteração de função dos queratinócitos, desde o *Stratum basale* até ao *Stratum corneum* (adaptado de *Junqueira's Basic Histology – Text and Atlas*).

Desta maneira, é relevante o estudo do processo de regeneração celular associado ao envelhecimento e a busca por novos agentes capazes de induzir a modulação dessa regeneração. Ainda que não existam muitos estudos acerca da atividade das antocianinas no processo de cicatrização, foi demonstrado que antocianinas do feijão de soja preto possuem atividade antioxidante e anti-inflamatória e promovem a cicatrização em ratos [95]. O estudo *in vivo* dos sistemas biológicos, como é o caso da pele, será sempre complexo, devido não só às dificuldades de manipulação do tecido,

como também à presença de inúmeras variáveis e à própria variabilidade dos sistemas biológicos. Desta maneira, torna-se fulcral a implementação de estudos *in vitro* que permitam uma manipulação completa do ambiente de experiência, de modo a garantir uma quantificação fidedigna e reproduzível. Tendo em conta que a camada mais externa da pele é constituída maioritariamente por queratinócitos e que, por isso, a regeneração celular e a recuperação da matriz extracelular dependem, em grande parte, destas células, a bioatividade dos pigmentos antociânicos foi estudada a partir de um modelo de monocamada de células HaCat (linha celular normal humana de queratinócitos). Considerando que células em cultura podem ser monitorizadas a partir de leituras de TEER (*Transepithelial/transendothelial electrical resistance*) [96], que está diretamente relacionada com a função de barreira, explorou-se a aplicação da ‘bioimpedância’ ao estudo do comportamento de uma cultura de células constituintes da pele, através do uso do sistema de medição de impedância de uma monocamada celular – o sistema ECIS.

5.1. *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)*

O sistema ECIS foi desenvolvido por *Giaever e Keese*, em 1991 e é, então, um método baseado na impedância e que serve ao estudo das atividades de células em crescimento, correlacionando as alterações nas leituras desse parâmetro físico com alterações morfológicas, locomoção celular e outros comportamentos celulares. Foram realizadas experiências iniciais com fibroblastos WI-38 de pulmão, normais e transformados, em que se relacionaram as leituras de impedância com a adesão e a proliferação das células [97]. Mais tarde, o sistema ECIS foi estabelecido como meio para realização de ensaios de citotoxicidade, tendo sido analisados os efeitos do Tween 20, do Triton-X100 e do dodecil sulfato de sódio em fibroblastos WI-38 e em células epiteliais MDCK [98]. Por outro lado, *Giaever e Keese* utilizaram ainda o sistema para analisar o movimento Browniano de culturas celulares, quantificando-o através do expoente de *Hurst* e diferenciando as linhas celulares WI-38 e WI-38 VA 13 [99].

O funcionamento desta técnica tem por base a aplicação de uma pequena corrente alternada (AC) a um padrão de elétrodos depositados no fundo de poços onde as células são inoculadas, e onde se fixam e proliferam (Figura 8).

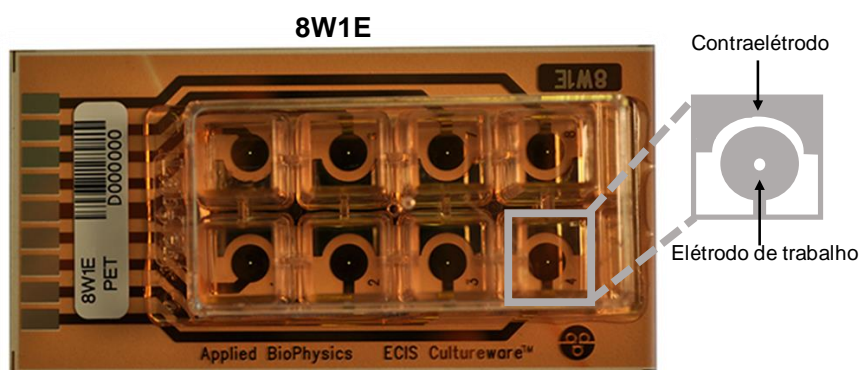


Figura 8. Matriz de oito poços com um eléctrodo de trabalho de 250 μm de diâmetro (8W1E) no centro de cada um. Dependendo do tipo celular o eléctrodo registará o comportamento de 50-100 células.

As medições são realizadas usando sinais de AC, ao invés de uma corrente contínua (DC), de modo a evitar a deposição de eletrólitos do meio de cultura no eléctrodo, o que causaria alterações nas suas propriedades, polarizando-os. Quando a corrente AC é aplicada ao eléctrodo, a voltagem resultante é medida e, desta forma, a impedância (Z) é facilmente calculada pela lei de Ohm: $Z = \frac{V}{I}$, onde V é a voltagem e I a corrente aplicada. O sistema ECIS mede não só a voltagem, mas também a fase dessa voltagem. Ora, a combinação destes valores permite que a impedância seja dividida em dois parâmetros: o da resistência (R) e o da reactância (X_c), sendo que este último se relaciona com a capacitância (C) associada à superfície do meio de cultura, isto é, do eletrólito. Tem-se que: $R = \frac{V_{em\ fase}}{I}$ e que $C = \frac{V_{fora\ de\ fase}}{I}$, sendo que a impedância é, então calculada por: $Z = (R^2 + X_c^2) \times 0.5$. O facto de a impedância ser composta por estas duas porções é importante para a análise dos resultados experimentais já que estas duas medidas permitem avaliar diferentes propriedades.

Relativamente à cultura de células, esta, como já referido, é realizada sobre um microeléctrodo de filme de ouro, com um diâmetro de 250 μm e depositado no centro de cada poço. O sistema possui ainda um contra-eléctrodo maior no topo da matriz de eléctrodos, o que permite que os eléctrodos de trabalho dominem as leituras de impedância. Isto acontece devido à diferença na área superficial, já que a área do pequeno eléctrodo central é de $5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ e a do contra-eléctrodo é de 0.15 cm^2 . Isto é, enquanto que a impedância da interface eléctrodo-eletrólito (a impedância de Faradaica) é inversamente proporcional à área do eléctrodo, a resistência de constrição (relacionada com a proliferação das células no eléctrodo) num meio condutor varia de acordo com $\frac{\rho}{2d}$, onde ρ é a resistividade e d é o diâmetro do eléctrodo. Assim, a impedância pode sempre dominar a resistência de constrição se forem usados eléctrodos suficientemente pequenos [100].

Desta maneira, quando as células são inoculadas, estas aderem aos elétrodos e funcionam como isolantes que fazem aumentar a impedância. À medida que as células proliferam, o elétrodo vai sendo coberto e a passagem de corrente é proporcionalmente impedida, de acordo com o número de células que o cobrem, com a morfologia das células em cultura e com a natureza da sua adesão.

Giaever e Keese desenvolveram também um modelo matemático para descrever as medições de impedância observados no ECIS, relacionando-os com a resistência de junção e a separação entre células e a matriz (Figura 9). A equação 1 descreve a matemática necessária ao cálculo da impedância específica de um elétrodo coberto por células. O modelo tem como importante premissa a aproximação de que as células são discos circulares com um raio, r_c .

$$\frac{1}{Z_c} = \frac{1}{Z_n} \left[\frac{Z_n}{Z_n + Z_m} + \frac{\frac{Z_n}{Z_n + Z_m}}{\frac{\gamma r_c I_0(\gamma r_c)}{2 I_1(\gamma r_c)} + R_b \left(\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right)} \right] \quad (1)$$

$Z_n(v)$ – Impedância de um elétrodo sem células.

ρ - resistividade do meio.

$Z_m(v)$ – Impedância da cultura de células.

I_0 e I_1 – Funções de Bessel modificadas do primeiro tipo.

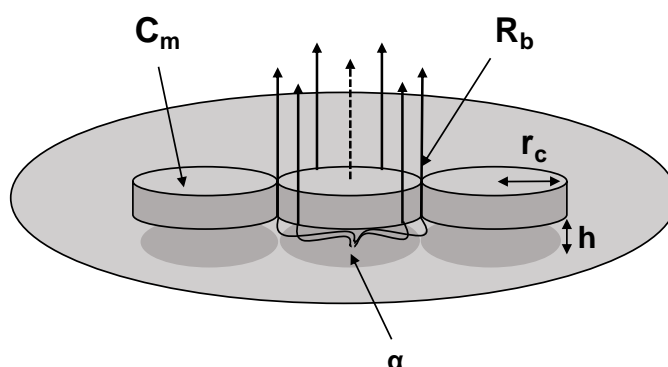


Figura 9. Modelo aplicado ao ECIS, válido para células em confluência. R_b – resistência de barreira (parâmetro paracelular); α – variação de impedância abaixo das células (relação entre células e matriz); C_m – capacitância de membrana; h – distância entre as células e o elétrodo; r_c – raio da célula (adaptado de *Applied Biophysics*).

A solução da equação (1) depende de dois parâmetros: R_b , a resistência entre as células por unidade de área e α , relacionada com a separação entre as células e a matriz, dados pelas equações (2) e (3):

$$(2) \quad \gamma r_c = r_c \sqrt{\frac{\rho}{h} \left(\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right)}$$

$$(3) \quad \gamma r_c = \alpha \sqrt{\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m}}$$

O sistema ECIS possui ainda uma outra importante característica que é o facto de permitir a aplicação de uma espectroscopia de frequências na interface entre a cultura celular e o eléctrodo. Isto é também possível graças à aplicação de uma corrente alternada, pois esta permite a leitura da voltagem *em-fase* e *fora-de-fase*. Desta maneira, quando se medem os valores de impedância a baixas frequências (< 4000 Hz), as leituras correspondem à corrente que flui sobretudo entre as células e os eléctrodos. Por outro lado, quando se medem frequências mais elevadas (superiores a 40 000 Hz), as leituras correspondem a uma maior passagem da corrente capaz de atravessar as membranas celulares. Portanto, entende-se que a elevadas frequências as medições de impedância são mais afetadas pela cobertura do eléctrodo, enquanto que a baixas frequências estas respondem sobretudo a alterações nos espaços entre as células e entre as células e a matriz.

O sistema ECIS é, então, um equipamento que permite estudar diferentes comportamentos celulares a partir de leituras de impedância. É possível, por exemplo, a realização de estudos de adesão e de proliferação [101, 102], de função de barreira [103-105], de citotoxicidade [106, 107], inflamação [108, 109], migração [110], ou ainda o estudo de metástases [111, 112]. Para além disto, é também possível analisar o sinal de ruído associado à cultura de células em monocamada, ou seja, é possível analisar os micromovimentos celulares. À medida que as células proliferam e se movem, ocupando o espaço sob o eléctrodo, os valores de impedância flutuam e aumentam. Quando a confluência é atingida as oscilações na impedância têm menor amplitude, mas não cessam, sendo que estas flutuações advêm do relaxamento seguido de nova ligação dos locais de adesão, o que é indicativo da presença de células vivas. É este ruído que pode ser medido através do ECIS e quantificado como medições dos micromovimentos. Esta análise foi, como já referido, primeiramente explorada por *Giaever e Keese* [99], mas outros autores estudaram já esta propriedade em determinados tipos celulares, relacionando-a com análises de citotoxicidade de certos compostos [113].

5.2. Novos derivados antociânicos

As antocianinas são compostos hidrossolúveis e, portanto, mais estáveis em matrizes hidrofílicas do que em matrizes apolares, como é o caso de grande parte dos produtos de cosmética, conhecidos pela sua natureza lipofílica. Assim, a elevada afinidade que as antocianinas possuem para sistemas aquosos poderá ser entendida como um obstáculo à utilização destes compostos naturais em formulações de loções, cremes, etc. É por isso relevante encontrar soluções para este problema que viabilizem o uso mais abrangente das antocianinas em matrizes com diferentes balanços

hidrofílico/lipofílico e que, ao mesmo tempo, garantam a manutenção das suas propriedades biológicas, ou até a sua melhoria. Têm sido desenvolvidas várias formas de estabilização destes flavonóides, como por exemplo recorrendo à microencapsulação dos compostos por diferentes técnicas como a liofilização ou a secagem por pulverização, entre outros [114, 115]. No entanto, após serem libertadas das suas cápsulas por estímulo externo, as antocianinas tornam-se instáveis. Assim, uma solução para aumentar a natureza hidrofóbica destes compostos relaciona-se com a modificação química da sua estrutura original, isto é, lipofilizando a antocianina, por esterificação de grupos hidroxilo da estrutura original com ácidos gordos. Existem já vários estudos realizados sobre a acilação química e enzimática de flavonóides que têm mostrado que esta melhora as propriedades dos compostos, como é o caso de alguns derivados de ácido gordo de flavan-3-óis que demonstraram ter elevada atividade antioxidante e anticancerígena, relativamente às suas formas originais [116]. No entanto, a modificação de antocianinas é mais complexa do que a acilação de outros flavonóides, devido à química dos compostos flavílios que, para além de possuírem carga positiva na forma de íão flavílio, possuem também baixa solubilidade em solventes orgânicos e pouca estabilidade em sistemas neutros e em condições básicas. Desta maneira, e devido à escassa informação encontrada na literatura, explorou-se, em trabalhos anteriores, a síntese enzimática de um novo derivado da malvidina-3-glucósido, obtida a partir de um extrato de vinho tinto, com o ácido oleico [117]. Esta esterificação foi catalisada pela lipase B de *Candida antarctica*. Esta enzima apresenta elevada estabilidade térmica e seletividade para álcoois primários o que é vantajoso para a reação em causa, já que o composto possui vários grupos hidroxilo livres, e ao recorrer-se à catálise pela lipase é possível obter um derivado acilado em detrimento de outros, nomeadamente um éster na posição C6 do resíduo de glucose, pois este é um álcool primário.

Desta forma, seguiu-se a informação disponível na literatura e sintetizou-se um conjunto de derivados lipofílicos de antocianinas, nomeadamente de derivados da mv3glc, por forma a entender de que forma a lipofilização de antocianinas com cadeias carbonadas de diferentes extensões poderá influenciar as propriedades químicas e biológicas destes novos compostos.

5.2.1. Estudo Atividade Antioxidante

Uma das características mais importantes das antocianinas e que é recorrentemente referida na literatura é o seu poder antioxidante. Este que, como já referido anteriormente, poderá ter um efeito preponderante no uso destes compostos em formulações de prevenção contra o envelhecimento precoce, já que neste estão

envolvidas cascatas de formação de ROS e, portanto, a aplicação tópica de antioxidantes poderá auxiliar a modulação e/ou neutralização da sinalização e/ou danos causados por estas espécies originadas aquando da exposição à radiação UV. Desta forma, o estudo do poder antioxidante destes novos derivados e a sua relação com os compostos originais é de elevada importância. Habitualmente, o efeito dos antioxidantes é medido pela monitorização da inibição da oxidação de um substrato adequado. O método aqui descrito para o estudo do poder antioxidante teve por base a peroxidação lipídica, já que este é um fenómeno mais próximo de um sistema real, relativamente aos habituais testes *in vitro* como é o caso do FRAP (*ferric reducing antioxidant power*) ou do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Estes foram realizados com recurso a lipossomas: vesículas compostas por uma membrana de moléculas lipídicas (normalmente fosfolípidos) que rodeiam um volume aquoso. Estas vesículas formam-se espontaneamente quando os lípidos são dispersos num meio aquoso, originando uma população de vesículas cujo tamanho pode variar entre 10 nm e 100 µm. Os fosfolípidos são os componentes principais das membranas biológicas e são moléculas anfipáticas que possuem uma ponte glicerol que liga um par de cadeias aciladas de hidrocarbonetos a uma cabeça polar hidrofílica. Os mais comuns são os ésteres de colina – as fosfatidilcolinas - que, em meio aquoso, formam uma bicamada por forma a minimizar as interações entre a fase aquosa e a cadeia acilada, sendo que, ao formarem vesículas, estas moléculas anulam as interações repulsivas, tornando-se estáveis. Os fosfolípidos utilizados neste estudo são uma mistura de fosfatidilcolinas que variam entre si no comprimento e grau de insaturação dos ácidos gordos. Estes são bons modelos para investigar os mecanismos de peroxidação lipídica e a ação antioxidante de alguns componentes biológicos na bicamada fosfolipídica, sendo que o método aqui utilizado foi descrito por Barclay e colaboradores em 1980 [118], quando mostraram que a oxidação de lipossomas de fosfolípidos de ovo iniciada por um gerador de radicais livres em solução tem a mesma cinética de autooxidação lipídica.

Objetivos

Objetivos

Este trabalho teve como principal objetivo o estudo de propriedades biológicas das antocianinas em células da pele, nomeadamente em queratinócitos, por forma a explorar as potenciais vantagens da sua incorporação em formulações de cosmética, particularmente de cuidado e bem-estar da pele e de anti-envelhecimento. As antocianinas são conhecidas por serem corantes naturais e potentes antioxidantes. A sua utilização em matrizes alimentares é já amplamente difundida como substitutos de corantes sintéticos. Desta forma, pretendeu-se com este trabalho estudar as propriedades de dois extratos antociânicos de vinho e de amora, assim como dos seus pigmentos maioritários: mv3glc e cy3glc, respetivamente. Para isso, além da realização de ensaios preliminares de atividade antiproliferativa, desenvolveu-se um modelo de monocamada de queratinócitos recorrendo ao sistema de *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* (ECIS). Este é um sistema de monitorização em tempo real que tem por base a leitura da impedância de células em cultura e que permite relacionar esse parâmetro físico com comportamentos celulares relevantes. Uma vez otimizado o modelo de queratinócitos foi possível realizar ensaios de citotoxicidade dos pigmentos, estabelecendo um protocolo para o estudo da citotoxicidade de outros compostos nesta linha celular, nomeadamente tendo por base o modelo de análise de Giaever e Keese e recorrendo à análise dos micromovimentos celulares. Recorrendo ainda a este equipamento, avaliou-se a atividade dos pigmentos antociânicos na cicatrização de uma monocamada de queratinócitos danificada eletricamente, por forma a explorar a possível atividade destes compostos como bioativos em formulações cosméticas de bem-estar da pele.

Numa segunda parte deste trabalho, avaliou-se o efeito das antocianinas do vinho e de amora na atividade enzimática de algumas enzimas da pele. Foi avaliado o efeito destes pigmentos em enzimas de manutenção da matriz extracelular, nomeadamente na atividade da collagenase e da elastase. Adicionalmente, avaliou-se o efeito destes flavonóides na atividade da tirosinase, a enzima-chave na produção de melanina e responsável por disfunções de pigmentação, muitas vezes associadas ao envelhecimento.

Numa terceira e última parte deste trabalho, procedeu-se à síntese de novos derivados lipofílicos da mv3glc. A capacidade antioxidante destes novos compostos foi avaliada e realizaram-se ainda ensaios de atividade antiproliferativa em queratinócitos, por forma a validar ensaios futuros de bioatividade.

Materiais e Métodos

Materiais e Métodos

1.1. Reagentes

O Gel RP-18 (40-63 μm) LiChroprep foi adquirido à Merck (Darmstadt, Alemanha). O metanol, o acetonitrilo, o ácido fórmico, o heptano e o ácido tricloroacético foram adquiridos à Chem-lab (Eernegem, West-Vlaanderen, Bélgica). O dimetilsulfóxido (DMSO), o acetato de etilo, o Trizma-base, e o sulfurodamina B, a gelatina (*from bovine skin*), a L-cisteína, e os meios de cultura DMEM-F12 e RPMI foram adquiridos à Sigma-Aldrich® (Madrid, Espanha). Colagenase de *Clostridium histolyticum* (ChC, EC 3.4.24.3), a Tirosinase de cogumelo (EC 1.14.18.1) e a Lípase B de *Candida antarctica* em resina acrílica (≥ 5000 U/g, recombinante, expressa em *Aspergillus nige* foram adquiridos à Sigma-Aldrich® Madrid, Espanha), Elastase pancreática de porco (PPE) foi adquirida à Calbiochem®. Os substratos: N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA, substrato para ChC), [N-Succ-(Ala)3-p-nitroanilide] (substrato para a PPE) e L-DOPA (substrato para a tirosinase) foram adquiridos à Sigma-Aldrich® Madrid, Espanha, assim como o PBS, a Tricina, o DMSO, o ácido butírico, o ácido hexanóico, o ácido octanóico, o ácido cáprico, o ácido dodecanóico e o ácido mirístico, a L- α -Fosfatidilcolina de soja, o Hepes, o Trolox e o NaCl.

1.2. Equipamentos

HPLC da marca Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific equipado com uma coluna fase reversa em coluna de gel C18 (150 x 127 mm x 4.6 mm i.d., Thermo Scientific). Equipamento de LC-MS da marca Finnigan Surveyor equipado com um detetor de massa LCQ DECA XP MAX (Finnigan Corp., San Jose, Calif.) e uma coluna de fase reversa C18 (150 x 127 mm x 4.6 mm i.d.). Leitor de placas de 96-poços da marca Biotek Powerwave XS. Equipamento ECIS, *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* obtido da Applied Biophysics, Troy, Ny, USA.

1.3. Obtenção dos extratos antociânicos e purificação das duas antocianinas maioritárias

Neste trabalho utilizaram-se extratos antociânicos de vinho e amora, assim como as suas antocianinas maioritárias isoladas: malvidina-3-glucósido e cianidina-3-glucósido, respetivamente. O extrato de vinho foi obtido como descrito na literatura [117]. Concentram-se 50 litros de vinho tinto num sistema de nanofiltração, seguido por evaporação do etanol. Os açúcares foram removidos por cromatografia reversa em gel

de sílica C18 e este extrato bruto foi liofilizado. Procedeu-se a uma extração líquido-líquido com acetato de etilo de 5 gramas do pó obtido, por forma a remover compostos orgânicos que não antocianinas. A fase aquosa foi depois aplicada num funil de Büchner carregado com gel de sílica C18 e as antocianinas 3-monoglucósidos foram eluídas com solução de 30 % metanol (MeOH) acidificada com HCl 0,01 %. O solvente foi evaporado e a fase aquosa foi concentrada e liofilizada. Este extrato foi depois analisado por HPLC-DAD e caracterizado por LC-MS. Procedeu-se, depois, à purificação da antocianina maioritária, mv3glc, a partir de frações de 20 mg do extrato anterior, que foram aplicadas numa coluna de cromatografia de fase reversa em gel de sílica C18, sendo que esta foi isolada das restantes antocianinas por eluição com 20% MeOH acidificado com 0,01% HCl. A pureza do composto isolado foi depois analisada por HPLC-DAD.

Obteve-se, também, um extrato rico em antocianinas de amora a partir de 1 kg de amoras frescas. A extração foi realizada com 5 litros de solução 50% de MeOH acidificado com 0,01% HCL, durante duas horas e sob agitação. Ao fim desse tempo, mudou-se a solução de solvente por outros 5 litros da mesma solução e deixou-se a extração decorrer durante mais 24 horas. O solvente MeOH foi evaporado e a fase aquosa foi aplicada a um funil de Büchner carregado com gel de fase reversa C18 para remoção de açúcares. Eluiu-se a totalidade de antocianinas com solução de 50% MeOH acidificado. Este solvente foi evaporado e a fase aquosa foi concentrada e liofilizada. Para purificação da cy3glc procedeu-se da mesma forma, contudo a eluição a partir do funil de Büchner foi realizada com 10% de MeOH, de modo a isolar a antocianina pretendida. Procedeu-se, depois, à concentração da fase aquosa e à sua liofilização. Analisaram-se as amostras por HPLC-DAD e LC-MS, de modo a caracterizar o extrato de amora e a calcular o grau de pureza do composto isolado.

1.4. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Os dois extratos assim como os compostos isolados, foram analisados como descritos na literatura [54], com algumas modificações. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta pressão com uma coluna de fase reversa C18. Os solventes utilizados foram (A) – água/ácido fórmico 9:1 (v:v) e (B) água/acetonitrilo/ácido fórmico 6:3:1 (v:v), com o seguinte gradiente: 20-80% B por 80 min, com um fluxo de 1,0 mL/min. A deteção foi realizada com um detetor fotodíodo, sendo que foi realizado o varrimento entre os 200 e os 600 nm, com obtenção do cromatograma a 280 e a 520 nm. Os compostos foram primeiramente identificados tendo em conta o seu tempo de reação e espectro UV-Vis, segundo informação disponibilizada na literatura [119].

1.5. Análise por Cromatografia Líquida com espectrómetro de massa (LC-MS)

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida equipado com um detetor de massa LCQ DECA XP MAX, uma fonte ionizante à pressão atmosférica (API) usando uma ionização por electrospray (ESI) e uma coluna de fase reversa C18 termostatzada a 25 °C usando os mesmos solventes que nas análises de HPLC descritas anteriormente. A deteção foi feita por espectrofotometria com um fotodíodo e por espectroscopia de massa. As voltagens do vaporizador e do capilar foram, respetivamente, 5 kV e 4 V. A temperatura do capilar foi de 325 °C. O azoto foi usado como revestimento e como gás auxiliar a um fluxo de 90 e 25, respetivamente (em unidades arbitrárias). O espectro foi obtido nos modos positivo e negativo com a gama de m/z entre 120 e 1500. O espectrómetro de massa foi programado para fazer uma série de scans: 'full mass' (MS), um 'zoom scan' do ião mais intenso (MS²) e uma análise MS-MS do ião mais intenso usando a energia de colisão relativa de 30 e 60 (MS³).

1.6. Cultura Celular

Uma linha celular aneuplóide imortal de queratinócitos de pele humana de adulto (HaCat) foi cultivada em monocamada com passagens entre 35 e 55. Como manutenção de rotina, as células foram inoculadas em caixas de Petri de 25 cm² e deixadas em cultura até à confluência, em meio DMEM-F12 ou RPMI, consoante a experiência. Os meios foram suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF) (inativado por calor) e com 1% de solução de antibiótico/antimicótico (100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B). As culturas celulares foram mantidas a 37 °C em atmosfera humidificada com 5% de CO₂. As células foram tripsinizadas (0,25% (peso/volume) tripsina-EDTA₄Na) duas vezes por semana.

1.7. Ensaio Sulforodamina B (SRB)

O efeito antiproliferativo dos extratos antociânicos, assim como das antocianinas puras foi avaliado para a linha celular HaCat recorrendo ao ensaio com sulforodamina B (SRB). Este ensaio tem por base a afinidade entre o corante e proteínas, já que este possui dois grupos sulfónico com afinidade para aminoácidos básicos, quando em condições acídicas, e que sofre dissociação em condições básicas. Realizou-se um ensaio prévio em que se células HaCat foram inoculadas em dois meios de cultura: RPMI,

e DMEM-F12. Verificou-se a impossibilidade de utilizar o meio de cultura DMEM-F12 para esta experiência, pois ocorria interação entre os constituintes do meio e o corante.

Desta maneira, inocularam-se células HaCat em placas de 96 poços à densidade de $1,5 \times 10^5$ cel/mL, em meio de cultura RPMI, e permitiu-se a sua adesão e o seu crescimento durante 24 horas. As soluções dos compostos a testar foram preparadas a partir de soluções stock de 200 mM em DMSO, sendo que a percentagem máxima de DMSO final foi de 0,05%, tendo-se verificado que esta concentração não possui efeito antiproliferativo para os queratinócitos. Seguiu-se uma incubação de 48 horas com os compostos a testar, aplicados numa gama de concentrações que variou entre 6,25 μ M e 100 μ M (num volume final de 100 μ L). Finalizado este tempo de incubação, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 50% (50 μ L) a cada poço, e as placas foram incubadas durante uma hora, a 4°C, o que permitiu que as células fossem fixadas ao fundo do poço. No final desse tempo, as placas foram lavadas 4x com água desionizada e, seguidamente, incubadas com 0,4% SRB em 1% de ácido acético (50 μ L), durante 30 minutos e protegidas da luz. As placas foram secas em estufa a 37°C e, depois de secas, o corante foi solubilizado em 100 μ L de Trizma-Base (10 mM e pH 8.0), incubando-se as placas durante 30 minutos à temperatura ambiente. Ao fim deste tempo a absorvância foi lida a 492 nm num leitor de placas de 96-poços. A citotoxicidade foi determinada como a percentagem de sobrevivência, calculada pelo número de células tratadas (T) sobre o controlo (C) x 100% (% T/C).

1.8. *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing – ECIS*

Utilizou-se o sistema comercial ECIS, *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing*, para realizar medições de impedância associada à proliferação de queratinócitos humanos. O sistema ECIS tem a capacidade de medir, simultaneamente, a resistência e a capacitância durante o crescimento de uma cultura celular. Esta foi realizada num chip de deteção denominado 8W1E, que consiste numa matriz de oito poços separados com 1 cm de altura e 0.8 cm² de área. No fundo de cada poço está depositado um microeléctrodo de 250 μ m de diâmetro, conectado em série a uma resistência de 1 M Ω , a um gerador de sinal de corrente alternada (AC) e a um contra-eléctrodo maior. Sendo que o sinal de AC tem uma amplitude de 1 μ A.

1.8.1. *Otimização do modelo de monocamada de queratinócitos em ECIS*

Os eléctrodos sofreram um tratamento prévio à inoculação das células HaCat, tal como descrito na literatura [120]. Eléctrodos 8W1E PET (polietileno) foram, primeiramente, tratados com uma solução 10 mM de L-cisteína, por 15 minutos, para limpeza dos

elétrodos e por forma a aumentar a reprodutibilidade relativamente à razão sinal-ruído. Os poços foram depois lavados com água ultrapura esterilizada (3x, 500 µL) e incubados com uma solução de 1% gelatina, por 30 minutos. Foram novamente lavados, e adicionou-se meio de cultura DMEM-F12 (500 µL) a cada poço de modo a avaliar os sinais basais de resistência e capacitância. O valor basal para este tipo de elétrodos ronda os 2000 Ω no caso da resistência, e 5 nF no caso da capacitância, como representado no exemplo da Tabela 3. Inocularam-se as células a duas densidades diferentes, por forma a compreender qual a mais apropriada à realização das experiências: 1.6×10^5 ou 1.6×10^6 cells/mL, em meio DMEM-F12, e num volume final de 500 µL. Os poços foram deixados fora da estufa por 30 minutos, permitindo a adesão uniforme das células ao fundo do poço evitando, assim, as correntes de convexão que se formam devido às diferenças de temperatura do meio e da estufa.

Ao fim de 20 horas em cultura o meio foi completamente mudado e permitiu-se a adaptação a estas condições por quatro horas, perfazendo 24 horas em cultura antes da realização das experiências. Neste momento, a confluência e a viabilidade da monocamada foi verificada por microscopia de campo claro e eletricamente pelas medições de impedância, analisando-se qual a densidade celular de inoculação mais apropriada.

Tabela 3 . Valores basais de resistência e capacitância para oito poços de um array 8W1E, após tratamento com cisteína.

Poço	Resistência (ohms)	Capacitância (nF)
A1	2059	4,80
A2	2081	4,91
A3	2114	4,87
A4	2008	4,94
A5	2123	4,98
A6	2100	5,13
A7	2408	4,78
A8	2136	5,05

1.8.2. Ensaios Citotoxicidade em ECIS

1.8.2.1. Controlo Negativo com DMSO

Por forma a validar este tipo de ensaios de citotoxicidade realizou-se, primeiramente, um controlo negativo com DMSO. Este foi escolhido para controlo já que é o solvente no qual todas as soluções stock foram preparadas e, além disso, por existirem indicações na literatura de que o DMSO possui citotoxicidade para várias linhas celulares [121, 122].

Assim, o efeito de quatro diferentes concentrações de DMSO nos valores de resistência associados a uma monocamada de células HaCat foi monitorizado, por incubação durante 24 horas. Assim, 250 μL de cada uma das soluções a testar: 0,05%, 1%, 5% e 10%, foi aplicado em cada poço ($n = 4$) e um controlo foi realizado apenas com meio de cultura. A impedância foi medida em cada poço a cada 2 minutos até os 16 poços terem sido medidos em sequência. A citotoxicidade foi avaliada aplicando o modelo matemático desenvolvido por *Giaever e Keese* [99] enunciado anteriormente e calculando, dessa forma, os parâmetros relativos à função de barreira da monocamada em cultura (R_b) e do espaço entre o lado ventral das células e o eletrodo (α), assim como a capacitância de membrana (C_m).

1.8.2.2. Citotoxicidade dos pigmentos antociânicos

A citotoxicidade dos extratos de vinho tinto e amora e dos pigmentos antociânicos isolados (mv3glc e cy3glc) foi avaliado recorrendo ao sistema ECIS. Para isto, após cultura das células HaCat durante 24 horas, adicionou-se cada uma das soluções dos compostos a testar (20 μM , 250 μL). Os ensaios foram realizados com um $n = 4 - 8$. Os parâmetros de R_b , α e C_m foram calculados após 24 horas de incubação. Realizaram-se ainda medições em RTC (*Rapid Time collect*) para análise dos micromovimentos das células em monocamada como medida da citotoxicidade dos compostos. Para isso, fizeram-se medições de impedância a cada segundo até à obtenção de 2048 pontos para cada poço e em sequência. Os dados de ruído obtidos foram normalizados e analisados através de três diferentes métodos numéricos [123]. Devido à natureza aleatória das oscilações dos valores de impedância, o primeiro método de análise é a aplicação da transformada de Fourier. Para isso, os 2048 pontos foram divididos em 4 grupos de 512 segundos e calculou-se o quadrado dos coeficientes de Fourier, chamados de espectros de potência (*power spectra*), sendo que se apresenta o valor médio desses valores. O segundo método utilizado é a variância estatística, calculada para diferentes intervalos temporais. Os 2048 pontos foram igualmente divididos em 4 grupos e a variância foi

calculada para cada grupo, tendo-se calculado a média desses valores. Repetiu-se este cálculo para grupos de 8, 16, 32, 64, etc e obteve-se a representação gráfica log-log da variância média em função do intervalo analisado (intervalo temporal). Por outro lado, os resultados dos micromovimentos foram analisados pelo cálculo da variância de incrementos, sendo que foram calculados valores para 2047 incrementos para intervalos de 1 segundo, por subtração sucessiva desses incrementos e cálculo da variância para esse incremento em específico. Aumenta-se depois o intervalo para 2 segundos, o que origina 1024 pontos e, portanto, 1023 incrementos, sendo que se prossegue com intervalos de 4, 8, 16, 32, 64, etc segundos. No caso da representação gráfica log-log da variância em função dos intervalos temporais ser uma linha reta, então satisfaz-se a condição de que as medições seguem um comportamento *fractal*, isto é, o sinal pode ser dividido em partes semelhantes ao objeto original. Assim, o expoente de *Hurst* pode ser calculado como o declive dessa recta.

1.8.2.3. Ensaio de Wound-healing no Sistema ECIS

Avaliou-se o efeito dos extratos e dos pigmentos antociânicos isolados no processo de cicatrização de uma monocamada de queratinócitos, por indução de um dano elétrico nessa camada. Estes ensaios foram realizados após incubação durante 24 horas dos extratos/compostos com as células em confluência, por aplicação de uma corrente AC de 2400 μ A, 60 kHz e por 60 segundos, que gerou a morte das células sobre o eléctrodo, verificada pela descida abrupta nos valores de impedância para valores basais. O processo de recuperação do dano infligido foi monitorizado, em tempo real, ocorrendo o aumento dos valores de impedância à medida que as células que circundavam o eléctrodo migravam e proliferavam para a superfície do eléctrodo.

1.9. Ensaios de Atividade Enzimática

Prepararam-se soluções tampão em DMSO dos extratos e dos pigmentos antociânicos a uma concentração de 200 mM e todas as restantes soluções para os diversos ensaios enzimáticos foram preparadas nos diferentes tampões a partir destas soluções stock e por forma a obter uma concentração final no poço de 50 μ M.

1.9.1. Atividade inibitória da Elastase

O ensaio realizado para a avaliação da atividade dos compostos na atividade da elastase teve por base métodos descritos na literatura [124]. Utilizou-se Suc-(Ala)3-p-nitroanilido como substrato da enzima, já que é específico para a atividade proteolítica da elastase pancreática. Após quebra proteolítica é libertado *p*-nitroanilido que é detetável

por espectrofotometria a 405 nm, usando um leitor de placas de UV-Vis. A elastase pancreática foi dissolvida em tampão fosfato, 0,1 M e a pH 6,8 e utilizada a uma concentração final, em cada poço, de 1 µg/mL. Foram preparadas soluções stock dos pigmentos a testar e estes foram incubados (30 µL) com a enzima por 10 minutos (20 µL), antes de se iniciar a reação. A reação foi iniciada por adição do substrato da enzima (30 µL, 600 µM), num volume final de 300 µL. A reação foi seguida durante 20 minutos, a 37 °C. A percentagem de inibição foi calculada através da seguinte fórmula:

$$Inibição \% = 1 - \frac{B}{A} \times 100$$

Onde A é a atividade da enzima na ausência de composto e B é a atividade da enzima na presença de composto. Foram realizados brancos na ausência de enzima por forma a descontar a absorvância proveniente do próprio composto em solução.

1.9.2. Atividade Inibitória da Colagenase

Os ensaios de atividade enzimática da colagenase na presença dos pigmentos antociânicos foram realizados como descrito na literatura [86]. Este foi realizado em 50 mM de tampão Tricina (pH 7,4, 400 mM NaCl e 10 mM CaCl₂). A colagenase de *Clostridium histolyticum* foi dissolvida em tampão para uma concentração inicial de 1,5 U/mL. O substrato sintético FALPGA foi também dissolvido em tampão Tricina a uma concentração inicial de 3 mM. Incubaram-se os compostos (50 µM) por 15 minutos com o substrato (300 µM) e iniciou-se a reação passado esse tempo com 0,1 U/mL de enzima, num volume final de 300 µL. A reação foi seguida durante 20 minutos em leitor de microplacas, tendo sido registada a diminuição na absorvância a 324 nm, e a 25°C. A percentagem de inibição foi calculada da seguinte forma:

$$Inibição \% = 1 - \frac{B_0 - B_{20}}{A_0 - A_{20}} \times 100$$

Sendo que A₀ é a absorvância inicial na ausência de antocianinas e A₂₀ é a absorvância ao final de 20 minutos de incubação da enzima com o substrato. B₀, por outro lado, é a absorvância inicial na presença dos pigmentos e B₂₀ refere-se à absorvância ao final de 20 minutos do conjunto enzima, substrato e polifenol.

1.9.3. Ensaio de inibição enzimática da Tirosinase

Os ensaios de atividade enzimática da tirosinase na presença dos pigmentos antociânicos foram realizados como descrito na literatura [125]. A tirosinase de cogumelo foi dissolvida em 50 mM PBS (pH 7,4) numa concentração de 1 mg/mL, enquanto que o L-DOPA foi dissolvido no mesmo tampão a uma concentração de 2,5 mM. A mistura reacional foi preparada num volume final de 300 µL, tendo-se incubado o substrato (60 µL, 500 µM) com os compostos cuja atividade se pretende estudar (30 µL, 50 µM). A reação foi iniciada por adição da enzima (20 µL) e esta foi seguida durante 20 minutos em leitor de placas, a 475 nm e 30 °C. A percentagem de inibição foi calculada segundo a fórmula seguinte:

$$\text{Inibição \%} = 1 - \frac{B}{A} \times 100$$

Onde A é a atividade da enzima na ausência de composto e B é a atividade da enzima na presença de composto. Foram realizados brancos sem a presença de enzima por forma a descontar a absorvância proveniente do próprio composto em solução.

1.9.4. Ensaio de Cinética Enzimática da Tirosinase

Realizaram-se ainda ensaios de cinética enzimática por forma a compreender o mecanismo de inibição associado aos diferentes extratos e pigmentos antociânicos estudados. Utilizou-se tirosinase de cogumelo (0,1 mg/mL) e L-DOPA como substrato numa gama de concentrações entre 0,1 e 1 mM. A mistura reacional foi preparada num volume final de 300 µL, tendo-se incubado o substrato (60 µL) com os compostos cuja atividade se pretende estudar (30 µL, 50 µM). A reação foi iniciada por adição da enzima (20 µL) e foi seguida durante 20 minutos em leitor de placas, a 475 nm e 30 °C.

1.10. Novos Derivados Acilados

1.10.1. Acilação enzimática da Malvidina-3-glucósido

Extratos enriquecidos em mv3glc foram obtidos como descrito no Capítulo I e utilizados como reagentes para as reações enzimáticas. As reações de esterificação das antocianinas monoglucósidos com ácidos gordos de cadeias carbonadas de diferentes tamanhos (ácido butírico, hexanóico, cáprico, decanóico, láurico, mirístico e palmítico) foram realizadas por adição de um extrato de mv3glc (9,47 µmol) e lipase (20 g/L) a um tubo de Schlenk com filtros moleculares de 4 Å ativados (100 g/L). A este tubo adicionou-se 2-metil-2-butanol anidro (2,5 mL) e a reação foi iniciada por adição do ácido gordo

respetivo (100 equivalentes) e mantida sobre agitação a 60 °C, por 9 ou 12 h consoante o tempo de reação máximo para cada ácido gordo, anteriormente estudado. As reações foram paradas por filtração dos filtros moleculares e da lipase e por adição de metanol acidificado (0,01 % HCl). O excesso de ácido gordo não esterificado foi removido por extração líquido-líquido com heptano. A fase orgânica foi evaporada e o éster antocianina-ácido gordo foi purificado por cromatografia de fase reversa em coluna de gel C18. A antocianina que não reagiu foi eluída com 30 % MeOH acidificado (0,01 % HCl) e o éster foi eluído com 70 % MeOH acidificado.

1.10.2. Análise por HPLC-DAD dos novos derivados

A pureza dos ésteres eluídos foi avaliada por análise de HPLC-DAD e LC-MS para os derivados de Mv3glc. Os solventes foram A – água/ácido fórmico (9:1) e B – acetonitrilo/ácido fórmico (9:1), com o seguinte gradiente: 0-20 % B por 5 min, 20-100 % por 10 min e isocrático 100 % B por 15 min com uma taxa de 0,4 mL/min. O éster antocianina-ácido gordo foi liofilizado e armazenado a -20 °C para posterior utilização em ensaios de peroxidação lipídica e em ensaios de atividade biológica.

1.10.3. Análise por LC-MS/ESI-MS dos novos derivados

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida equipado com um detetor de massa LCQ DECA XP MAX, uma fonte ionizante à pressão atmosférica (API) usando uma ionização por electrospray (ESI) e uma coluna de fase reversa (150 mm x 2, mm, i.d., 5 µm, Vydac 208TP 123 C8, Grace Davison Discovery Sciences) termostatzada a 25 °C usando os mesmos solventes que nas análises de HPLC descritas anteriormente. A deteção foi feita por espectrofotometria e por espectroscopia de massa. As voltagens do vaporizador e do capilar foram, respetivamente, 5 kV e 4 V. A temperatura do capilar foi de 325 °C. O azoto foi usado como revestimento e como gás auxiliar a um fluxo de 90 e 25, respetivamente (em unidades arbitrárias). O espectro foi obtido no modo positivo com a gama de m/z entre 250 e 1500. O espectrómetro de massa foi programado para fazer uma série de scans: 'full mass' (MS), um 'zoom scan' (MS²) e uma análise MS-MS do ião mais intenso usando a energia de colisão relativa de 30 e 60 (MS³).

1.10.4. Ensaio de atividade Antioxidante

Os lipossomas foram preparados como descrito na literatura [126]. Uma solução de L-α-fosfatidilcolina de soja em clorofórmio foi evaporada à secura com uma corrente de árgon. Seguidamente, e por forma a garantir a eliminação de todos os vestígios do solvente orgânico, o filme lipídico foi colocado sob vácuo durante três horas. Após esse

período, o filme foi ressuspendido em tampão Hepes (10 mM, 0,1 M NaCl, pH 7,4), por agitação vigorosa. Em seguida, realizaram-se cinco ciclos de congelação/descongelação por forma a normalizar o espaço interno das vesículas então formadas, sendo que a congelação foi realizada por mergulho da solução em azoto líquido e que a descongelação se realizou a 37 °C. No final dos ciclos, a solução foi mantida a 37 °C durante meia hora para que esta atingisse o equilíbrio e, por fim, realizou-se a extrusão da solução, num extrusor de ácido inoxidável (Lipex), tendo sido utilizado um filtro de polycarbonato (Corning, 100 nm).

A peroxidação lipídica dos lipossomas foi induzida por radicais peroxilo ($\text{LOO}\cdot$) gerados a uma razão constante, por degradação térmica do AAPH, hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-metilpropanimidamida), na presença e na ausência de antocianinas e de um antioxidante de referência (Trolox), sendo que a reação de peroxidação foi seguida por monitorização do consumo de oxigénio da solução. Tendo sido já otimizadas as condições ótimas para a realização deste ensaio, reproduziu-se a mistura reacional na célula de reação como descrita na literatura [126]: 150 μL solução de lipossomas unilamelares (concentração de 340 μM), 2 μL de solução stock de antioxidante de referência e antioxidantes (concentração de 100 μM), e o iniciador da reação (AAPH) numa concentração de 10 mM, num volume final de 1500 μL em tampão Hepes. O consumo de oxigénio foi monitorizado continuamente com recurso a um eléctrodo de oxigénio do tipo Clark (Hansatech®) numa célula fechada e à temperatura de 37 °C, sob agitação, como descrito anteriormente na literatura. A capacidade antioxidante foi avaliada graficamente pelo período de indução, calculado através da interseção das tangentes das retas traçadas no período em que a oxidação é inibida pelo antioxidante e em que esta inibição deixa de acontecer, como indicado na Figura 10.

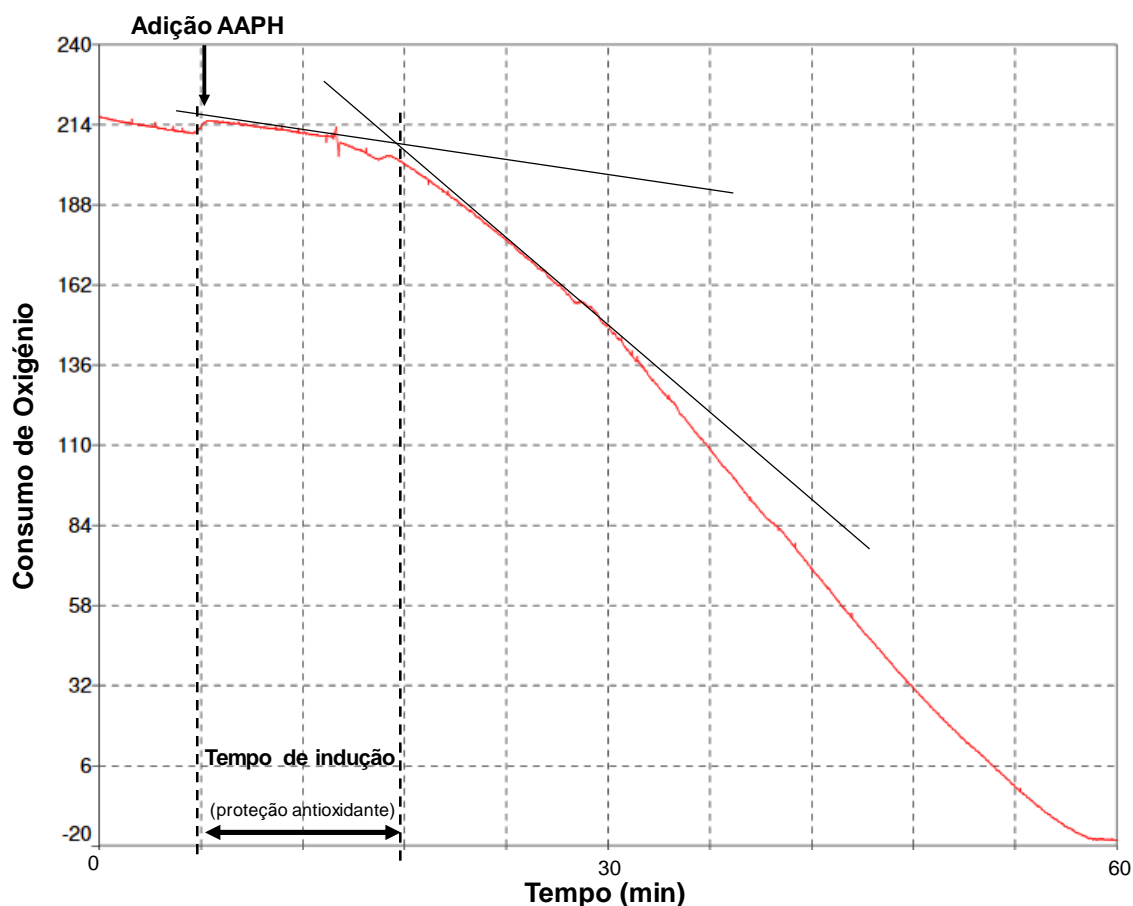


Figura 10. Monitorização do consumo de oxigénio na presença e na ausência de antioxidantes.

1.10.5. Ensaio Sulforodamina B (SRB)

O efeito antiproliferativo dos novos derivados de mv3glc foi avaliado como descrito no Capítulo I. Desta maneira, inocularam-se células HaCat em placas de 96 poços à densidade de 1×10^5 cel/mL e em meio RPMI, e permitiu-se a sua adesão e o seu crescimento durante 24 horas. As soluções dos derivados acilados foram preparadas a partir de soluções stock de 200 mM em DMSO, sendo que a percentagem máxima de DMSO final foi de 0,4 %, tendo sido realizado um controlo com uma gama de concentrações 0,012 – 0,4 % DMSO e que o efeito do solvente foi descontado aos resultados obtidos para cada composto. Seguiu-se uma incubação de 48 horas com os compostos a testar, aplicados numa gama de concentrações que variou entre 6,25 μ M e 100 μ M (para um volume final de 100 μ L). Finalizado este tempo de incubação, foi adicionado TCA 50 % (50 μ L) a cada poço, e as placas foram incubadas durante uma hora, a 4 °C, o que permitiu que as células fossem fixadas ao fundo do poço. Ao final desse tempo, as placas foram lavadas 4x com água desionizada e, seguidamente, incubadas com 0,4 % SRB em 1 % de ácido acético (50 μ L), durante 30 minutos e protegidas da luz. As placas foram secas em estufa a 37°C e, depois de secas, o corante

foi solubilizado em 100 μ L de Trizma-Base (10 mM e pH 8,0), incubando-se as placas durante 30 minutos à temperatura ambiente. Ao fim deste tempo a absorvância foi lida a 492 nm. A citotoxicidade foi determinada como a percentagem de sobrevivência, calculada pelo número de células tratadas (T) sobre o controlo (C) x 100% (% T/C).

1.11. Análise Estatística

Todos os ensaios foram realizados com pelo menos $n = 3$ repetições. Os valores apresentados representam a média aritmética \pm SEM e as diferenças estatísticas foram analisadas por *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Bonferoni. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$. Todos os dados estatísticos foram processados pelo programa *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (GraphPad software, San Diego, EUA).

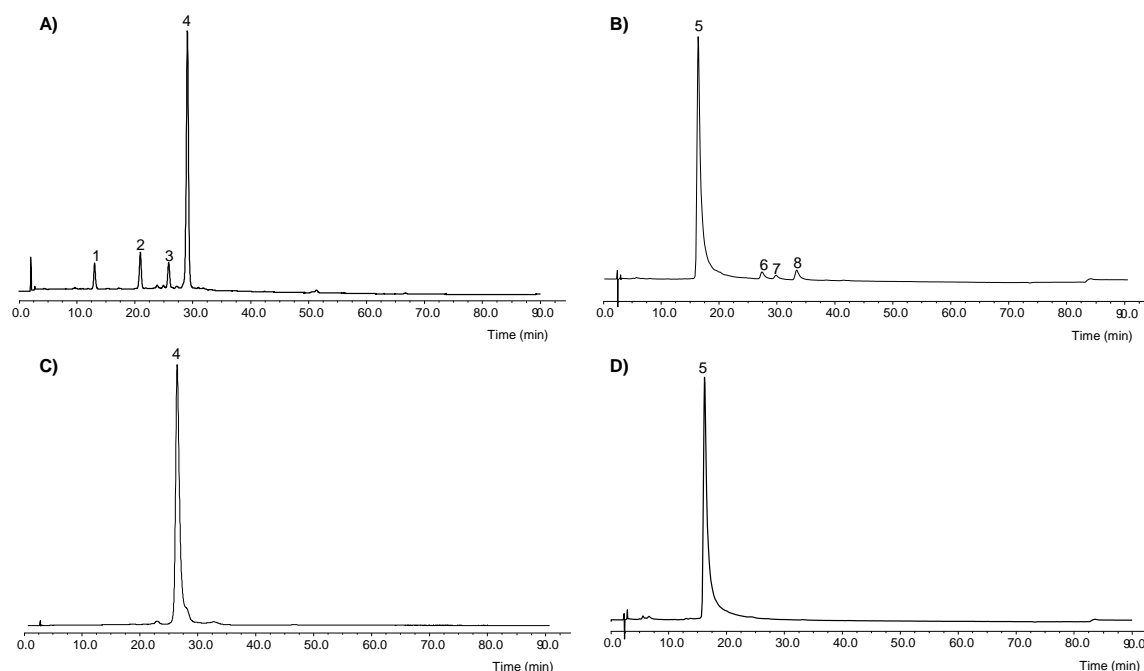
Resultados e Discussão

1. Caracterização e bioatividade dos extratos e pigmentos antociânicos

1.1. Caracterização dos extratos por HPLC-DAD e LC-MS e purificação das antocianinas maioritárias

A extração e purificação das antocianinas do vinho e da amora foi analisada por HPLC-DAD (Figura 11) e LC-MS (Tabela 4), por forma a caracterizar os extratos antociânicos e a verificar a pureza dos pigmentos maioritários isolados. O extrato obtido a partir do vinho tinto rico em antocianinas foi analisado e pôde confirmar-se a presença maioritária de malvidina-3-glucósido (4, Mv3glc). Os restantes picos minoritários correspondem às seguintes antocianinas: 1, delphinidina-3-glucósido (Dp3glc), 2, petunidina-3-glucósido (Pt3glc), 3, peonidin-3-glucósido (Pn3glc) (Figura 11 – A). No extrato obtido a partir de amoras foram identificadas quatro antocianinas derivadas da cianidina: 5, cianidina-3-glucósido (Cy3glc), 6, cianidina-3-rutinósido (Cy3rut), 7, cianidina-3-dioxaloil-glucósido (Cy3dioxaglc), e, 8, cianidina-3-malonil-glucósido (Cy3manglc) (Figura 9 - B).

Figura 11. Cromatogramas representativos das análises por HPLC das antocianinas isoladas a partir de um extrato de vinho (A) e da antocianina maioritária, Mv3glc (C), assim como do extrato antociânico de amora (B) e da antocianina



maioritária, Cy3glc (D) isolada a partir desse extrato. 1) Dp3glc: delphinidina-3-O-glucósido; 2) Pt3glc: petunidina-3-O-glucósido 3) Pn3glc: peonidina-3-O-glucósido; 4) Mv3glc: malvidina-3-O-glucósido; 5) Cy3glc: Cianidina-3-O-glucósido; 6) Cy3rut: Cianidina-3-rutinósido, 7) Cy3dioxaglc: Cianidina-3-dioxaloyl-glucósido e 8) Cy3manglc: Cianidina-3-malonyl-glucósido.

Tabela 4. Identificação estrutural por HPLC-MS das antocianinas presentes nos extratos de vinho e de amora.

Extrato	[MS] ⁺ m/z	MS ² m/z
Vinho		
Dp3glc, 1	465	303
Pt3glc, 2	479	317
Pn3glc, 3	463	301
Mv3glc, 4	493	331
Amora		
Cy3glc, 5	449	287
Cy3rut, 6	595/449	287
Cy3diocaglc, 7	593	287
Cy3manglc, 8	535	287

As antocianinas maioritárias de ambos os extratos (Mv3glc e Cy3glc) foram isoladas e esta purificação foi avaliada por HPLC, tendo sido calculado um grau de pureza de 85.44 % e de 98.30 %, respetivamente (Figura 11 – C e D). As estruturas químicas dos compostos identificados estão representadas na Figura 12.

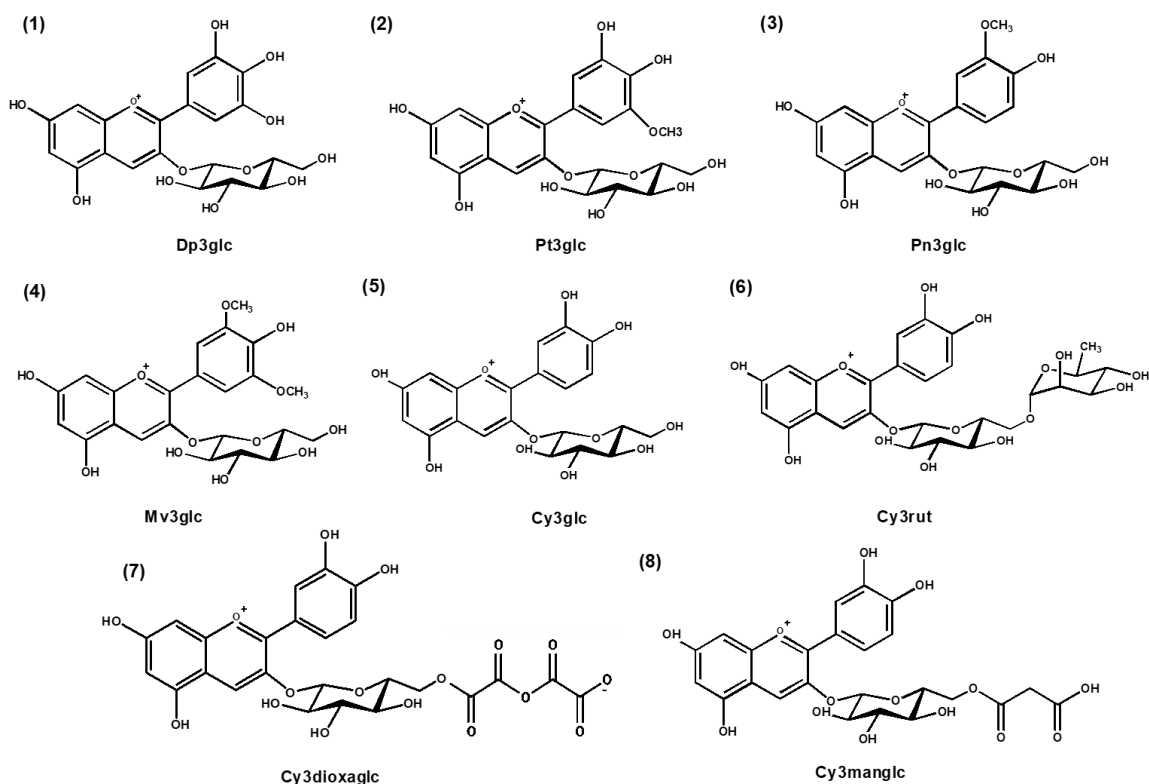


Figura 12. Estruturas químicas dos pigmentos antociânicos identificados nos extratos de vinho tinto e de amora.

1.2. Efeito antiproliferativo dos pigmentos antociânicos em queratinócitos

O efeito antiproliferativo em queratinócitos dos extratos antociânicos obtidos assim como dos pigmentos isolados foi averiguado através do ensaio colorimétrico SRB, realizado na fase exponencial de crescimento das células HaCat e por quantificação da proteína como método indireto do número de células em cultura. O ensaio foi, então,

realizado, por exposição de células HaCat a uma série de concentrações (6,25 a 100,00 μM) de cada um dos compostos ou extratos durante 48 horas (Figura 13).

Estes extratos, assim como os compostos isolados não apresentaram citotoxicidade para a gama de concentrações utilizadas, com a exceção do extrato de amora à concentração máxima testada, que apresentou um grau de inibição de 27 %. Isto pode ser devido à presença de outros derivados de cianidina que não a cy3glc, já que o pigmento isolado não afeta a proliferação dos queratinócitos, ou ainda por efeito sinérgico entre os vários derivados. Considerando a possível aplicação destes compostos em formulações cosméticas, os testes biológicos que se apresentam foram realizados à concentração de 20 μM , já que a concentração máxima de um composto ativo em formulações é de 1 %, embora a maioria dos produtos apresente uma concentração muito inferior. Um exemplo reportado para um extrato de uva varia entre de 0,4 a 0,5 % [127]. É preciso ainda notar que estes são ensaios *in vitro* com um único tipo de células em monocamada e que ensaios futuros que explorem sistemas mais complexos e representativos da pele poderão necessitar de concentrações superiores. Desta maneira, a concentração de 20 μM foi validada para uso em estudos posteriores, já que os compostos não apresentaram efeito antiproliferativo, o que validará estudos de cicatrização, por exemplo.

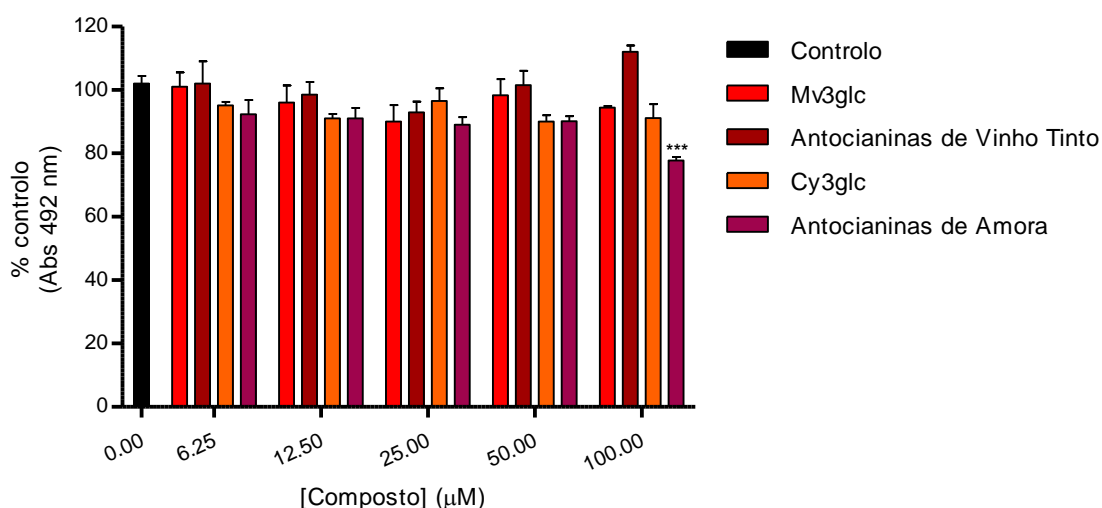


Figura 13. Efeito dos extratos antociânicos e das antocianinas purificadas mv3glc e cy3glc na proliferação de células HaCat, avaliado por ensaio de SRB. As células foram inoculadas em placas de 96 poços e tratadas com uma gama de concentrações de cada composto (6,25 – 100,00 μM), por 48 horas. Cada valor representa a média \pm SEM (n=6) ***p < 0,001 (diminuição significativa relativamente ao controlo).

1.3. Otimização das condições de cultura em sistema ECIS

A utilização de pigmentos em cosmética com uma função acrescida àquela de corante, isto é, com o intuito de se aplicarem compostos como princípio ativo de formulações implica não só a realização de testes fundamentais de citotoxicidade como também que se explorem as atividades biológicas relevantes desses metabolitos. De facto, a realização desse tipo de ensaios *in vitro* requer a otimização de um modelo de monocamada a partir do qual se possa estudar o comportamento de células da pele na presença de pigmentos antociânicos. Para isso, recorreu-se ao sistema ECIS, que permite avaliar a formação de uma monocamada de células em tempo real, assim como o estudo de diferentes comportamentos celulares. A otimização teve como ponto-chave a densidade celular no momento de inoculação. De facto, este é um ponto fulcral para a exequibilidade da experiência, já que uma densidade celular inadequada produz tempos de cultura longos até à confluência, o que pode inviabilizar a realização da experiência. Desta maneira, testaram-se duas densidades celulares diferentes no momento de inoculação: $1,6 \times 10^5$ e $1,6 \times 10^6$ cells/mL. À medida que as células aderem à superfície dos elétrodos, a resistência aumenta. Isto acontece porque a passagem de corrente é impedida, já que as membranas celulares das células que proliferam sobre os elétrodos funcionam como isolantes. Na Figura 14 encontram-se as representações gráficas exemplificativas para cada uma das densidades de inoculação, relativamente aos valores de resistência, a uma frequência de 4 kHz.

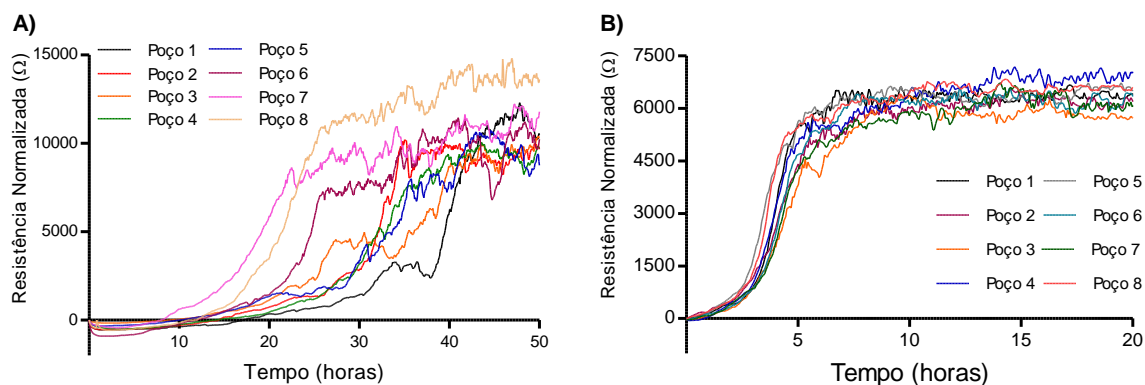


Figure 14. Representações de uma matriz de oito poços do tipo 8W1E PET A) inoculado com uma densidade celular de $1,6 \times 10^5$ células/mL ou B) $1,6 \times 10^6$ células/mL, em meio DMEM-F12. Os valores de resistência foram medidos a 4 kHz e normalizados tendo em conta os valores basais dos elétrodos ($R_n - R_0$).

Há uma diferença muito significativa entre as duas densidades estudadas. Enquanto que os poços inoculados a uma densidade de $1,6 \times 10^5$ cells/mL, demoram mais de 50 horas a atingir a confluência, sem que haja reprodutibilidade entre poços, aqueles com uma densidade de $1,6 \times 10^6$ cells/mL, formam uma monocamada em apenas

10 horas, prevalecendo um comportamento semelhante entre todos os poços. Assim que a confluência é atingida, os valores de resistência estabilizam, mas flutuam ligeiramente com o tempo, devido aos micromovimentos da monocamada celular, sendo que este é um indicativo da presença de células vivas. Assim, estabeleceu-se a densidade de inoculação ótima de $1,6 \times 10^6$ cells/mL e, em seguida, analisaram-se os dados de capacitância de modo a compreender a adesão e proliferação desta linha celular neste tipo de ambiente, isto é, o seu comportamento nos microelétrodos de ouro quando pré-tratados e revestidos por uma solução de 1% de gelatina. Para isso, foram calculados dois parâmetros diferentes: $t^{1/2}$, que é o tempo necessário para que a capacitância baixe para metade do seu valor máximo, isto é, o tempo necessário para que metade do elétrodo esteja coberto de células (o “*doubling time*” das células HaCat nestas condições de cultura) e o declive da regressão linear aplicada à curva de capacitância em função do tempo, entre 1,0 e 6,0 nF, correspondendo à velocidade de proliferação dos queratinócitos, s.

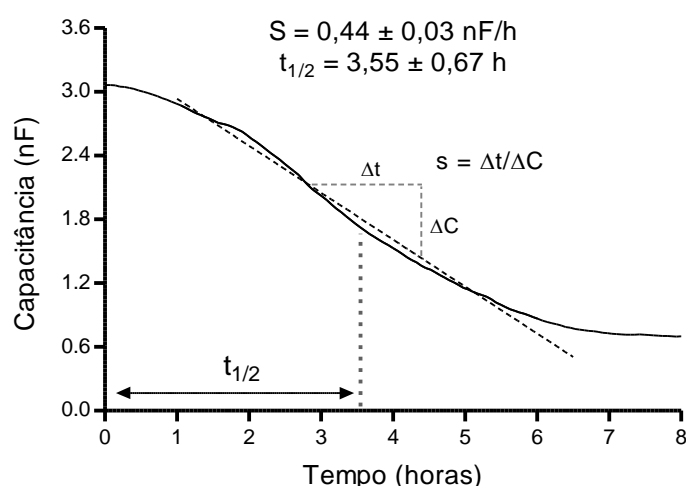


Figura 15. Representação gráfica exemplificativa para um poço dos valores de capacitância, registados a uma frequência de 64 kHz, quando células HaCat são inoculadas a uma densidade celular de $1,6 \times 10^6$ cel/mL. Calcularam-se dois parâmetros com base nestes resultados, de modo a caracterizar a adesão e proliferação dos queratinócitos nos microelétrodos revestidos de gelatina. $T_{1/2}$ refere-se ao tempo necessário para que os valores de capacitância sejam metade do valor máximo inicial. A taxa de proliferação também foi calculada, como o declive da regressão linear aplicada entre $C = 1,0$ e $6,0$ nF. Estes parâmetros foram calculados tendo por base resultados de oito poços independentes e são apresentados como a média \pm SEM ($n = 8$).

O tempo ao qual metade da área do elétrodo estava coberto é de, aproximadamente, 3,55 horas, e a taxa de proliferação foi calculada como sendo $0,44 \pm 0,03$ nF por hora (Figura 15). Estes parâmetros foram calculados tendo por base resultados experimentais de oito poços independentes e mostram que a densidade celular ótima produz

experiências reprodutíveis e que o tempo que os poços demoram a atingir a confluência é adequado à realização das experiências que serão sequencialmente descritas.

1.4. Scan de frequências

A análise dos valores de impedância é habitualmente feita recorrendo a leituras de uma única frequência, contudo, podem ser feitas medições a uma gama alargada de frequências, denominada de espectroscopia de frequências. Este varrimento de frequências permite escolher quais as melhores frequências para se analisarem os resultados referentes à capacitância e à resistência para um tipo celular em específico. A cada tempo de medição de impedância são realizadas medições numa gama de frequências entre os 25 Hz e os 60 kHz. A análise de um gráfico log-log de resistência ou de capacitância em função de frequência permite verificar uma diferença clara entre o que acontece num eletrodo livre de células e num eletrodo onde as células aderem e crescem (Figura 16). Quando observamos valores elevados de frequência e as células começam a cobrir o eletrodo, a resistência aumenta e a capacitância diminui, já que as células impedem a passagem de alguma corrente. A baixas frequências, por outro lado, verifica-se que nem a resistência nem a capacitância parecem ser afetadas, e isto acontece porque a impedância da interface eletrodo-eletrólito domina a impedância que é medida, sendo que as alterações na impedância se devem a alterações morfológicas das células e não podem ser explicadas por alterações na condutividade do meio. Quando se analisam os valores de resistência num gráfico log-log desses valores em função da frequência verifica-se que a maior diferença entre um eletrodo livre e um coberto de células se encontra a 10^4 Hz, sendo que este valor é próximo da literatura para as linhas celulares de fibroblastos WI-38 VA13 e HGF, assim como para as células HUVEC [128]. Por outro lado, em relação aos valores de capacitância verifica-se que a maior distância entre poços com e sem células ocorre aos 10^5 Hz. Esta discrepância entre resistência e capacitância é explicada pela forma como a corrente atravessa a monocamada de células, já que valores de frequência mais baixas atravessam o espaço entre as células e que para frequências mais elevadas a corrente é capaz de atravessar as células. Os valores ótimos de leitura das duas partes que compõem a impedância são dependentes do tipo celular e deverão ser calculados antes de serem realizadas outras experiências em ECIS.

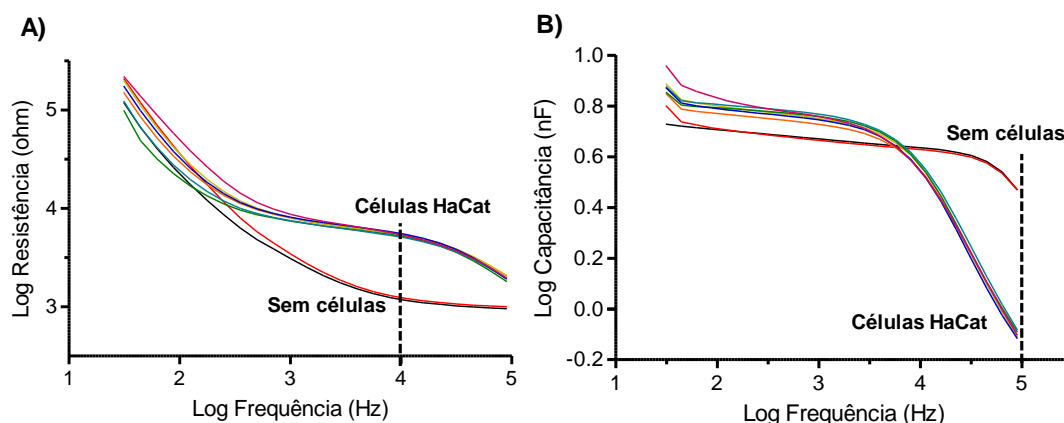


Figura 16. Gráfico log-log dos valores de resistência A) e de capacitância B) medidos em função da frequência de eletrodos livres de células e com culturas confluentes.

1.5. Ensaios de citotoxicidade

Após ter sido realizada a otimização do modelo de HaCat em ECIS, o primeiro teste a ser realizado diz respeito à citotoxicidade dos pigmentos antociânicos de modo a completar os dados já obtidos relativamente à atividade antiproliferativa com o ensaio de SRB, onde estes compostos revelaram não serem tóxicos para esta linha celular, até uma concentração máximo de 100 μM .

1.5.1. Controlo negativo com DMSO

O efeito de quatro concentrações diferentes de DMSO nos valores de impedância de uma monocamada de células HaCat foi monitorizado durante 24 horas. Fizeram-se leituras sucessivas de dezasseis eletrodos em sequência, cada ponto demorando alguns segundos a ser recolhido. Os resultados obtidos são aqui apresentados como os valores de resistência normalizados para o valor inicial de cada corrida (Figura 17). Observa-se uma descida drástica nos valores de resistência imediatamente após a aplicação das soluções de 5 e 10 % de DMSO, enquanto que para as concentrações mais baixas (0.01 e 1 %) aparentam não ter um efeito significativo nos valores de resistência, considerando aqueles referentes ao controlo.

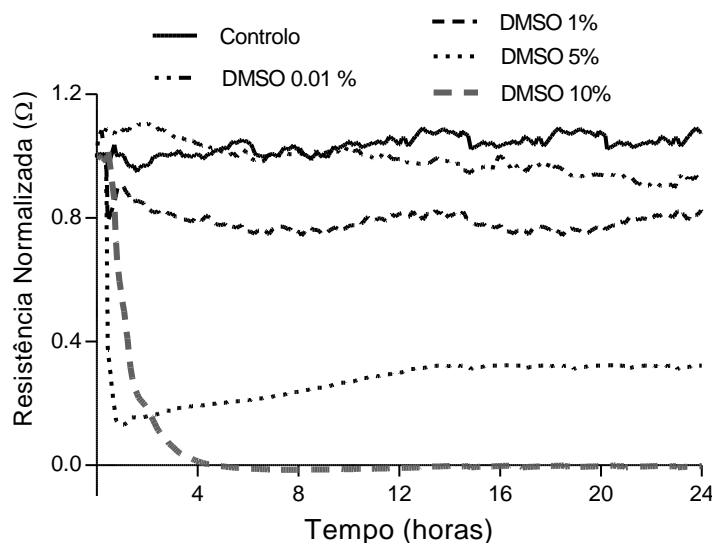


Figura 17. Resultados obtidos para o controlo negativo realizado, o DMSO. Os valores de resistência foram normalizados ao valor de resistência imediatamente anterior à aplicação das diferentes concentrações do solvente ($\frac{R_n}{R_0}$). Testaram-se quatro concentrações (0,01, 1, 5 e 10% de DMSO em DMEM-F12), por incubação de uma monocamada de células HaCat durante 24 horas.

De modo a entender melhor a citotoxicidade do DMSO, foram aplicadas duas estratégias. Realizou-se um varrimento das medidas de frequência, ao final das 24 horas de incubação e para as quatro concentrações de DMSO testadas, por forma a analisar as diferenças nas curvas de resistência. Para isso, os valores foram normalizados, dividindo os valores correspondentes aos elétrodos cobertos com células por valores de um eletrodo livre de células, tal como já explorado na literatura [123].

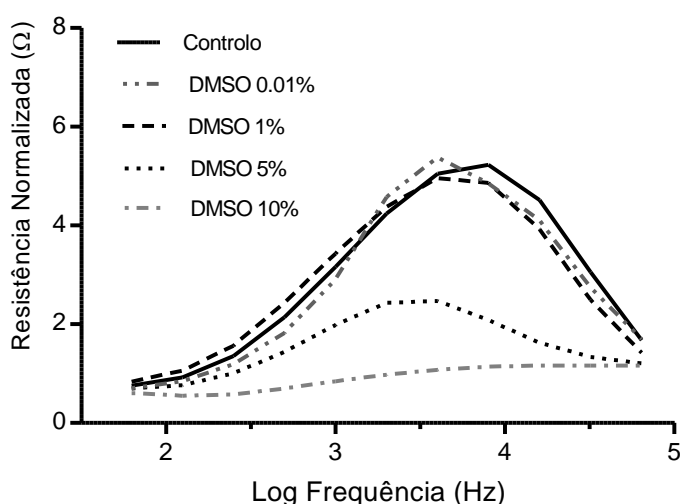


Figura 18. Representação gráfica dos valores normalizados de resistência ($\frac{R_n}{R_{\text{poço sem células}}}$) em função do Log (frequência), obtido 24 horas após a adição das soluções de diferentes concentrações de DMSO.

Como se observa na Figura 18, que representa os valores normalizados de resistência em função do logaritmo dos valores de resistência, ocorre um pico para o controlo, para a frequência de 10^4 Hz. Este pico era o esperado, tal como já explorado anteriormente, já que esta é a frequência para a qual se encontra uma maior diferença entre um eléctrodo livre de células e um coberto por uma monocamada de células. Isto parece manter-se para as concentrações de 0.01 e 1% DMSO, e desaparece com o aumento de concentração, sendo que para as concentrações de 5 e 10% há uma aproximação aos valores de um eléctrodo livre de células, pois as células nestes poços sofreram a toxicidade do solvente, tornando-se inviáveis. Isto é facilmente observado na Figura 17, a partir de imagens obtidas por microscopia de campo claro.

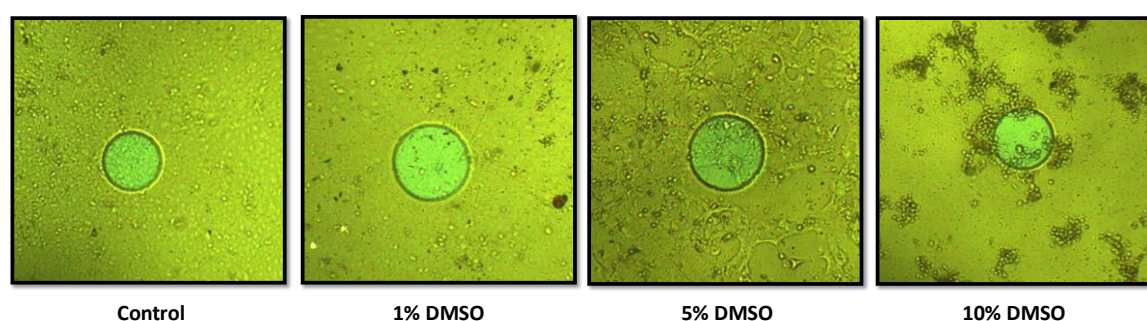


Figura 19. Imagens de microscopia de campo claro da cultura de células HaCat em eléctrodos do sistema ECIS após incubação com soluções de diferentes concentrações DMSO (0, 1, 5 e 10%).

Para além disto, aplicou-se ainda o modelo matemático descrito por Giaever e Keese, de modo a calcular os parâmetros R_b e α , que são medidas de interação célula-célula e célula-matriz, respetivamente, assim como C_m , como medida de integridade de membrana. Os resultados são apresentados na Tabela 5 e é de notar que foi possível aplicar o modelo apenas para as concentrações de 0.01 e 1% DMSO, já que as restantes causaram dano na monocamada de células o que inviabiliza a modelação, pois esta assume que a confluência é atingida no poço. Analisando os resultados obtidos, verifica-se que não existem diferenças estatísticas para qualquer um dos parâmetros, tendo estes sido analisados estatisticamente por *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. Isto indica que o DMSO até à concentração de 1% não causa danos na monocamada de queratinócitos nem na integridade da membrana celular.

Tabela 5. Parâmetros do modelo de ECIS calculados para uma monocamada de células HaCat, após 24 horas de incubação com DMSO. Foram apenas obtidos valores para as concentrações de 0.01 e 1%, já que as mais elevadas causaram danos à monocamada, inviabilizando a aplicação do modelo.

% DMSO	R _b ($\Omega \text{ cm}^2$)	α ($\Omega^{0.5} \text{ cm}$)	C _m ($\mu\text{F/cm}^2$)
0	2.23 ± 0.50	2.25 ± 0.14	2.48 ± 0.06
0.01	2.41 ± 0.04	2.41 ± 0.13	2.78 ± 0.14
1	2.22 ± 0.45	2.24 ± 0.37	2.46 ± 0.10

1.5.2. Extratos antociânicos e compostos isolados

Após terem sido analisados os resultados obtidos para o controlo negativo, realizaram-se ensaios de citotoxicidade para os pigmentos antociânicos de vinho e de amora, assim como para as antocianinas 3-glucósidas maioritárias. Estes são apresentados na Figura 20, onde se representa um gráfico típico de resistência normalizada ao seu valor exatamente anterior à adição dos compostos e em função do tempo. Os compostos antociânicos mostraram não possuir efeito nos valores de resistência ao longo das 24 horas de incubação com as células.

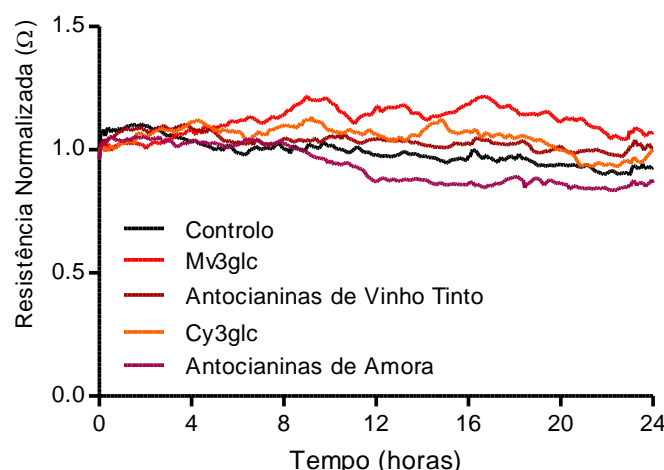


Figura 20. Representação gráfica exemplificativa de ensaios de citotoxicidade em ECIS para os extratos antociânicos de vinho tinto e de amora, assim como as antocianinas isoladas Mv3glc e Cy3glc. Os valores de resistência estão normalizados ao valor de resistência imediatamente anterior à adição dos compostos ($\frac{R_n}{R_0}$).

Desta maneira, e por forma a melhor entender o efeito destes polifenóis na integridade da monocamada de queratinócitos, modelaram-se os valores de impedância e calcularam-se os parâmetros de R_b, α e C_m através do software ECIS (Tabela 6), não se observando diferenças estatísticas entre os compostos, para a concentração testada de 20 μM .

Tabela 6. Parâmetros calculados a partir do modelo do sistema ECIS para uma monocamada de células HaCat, 24 horas após incubarem com os extratos e com os pigmentos antociânicos isolados, a uma concentração de 20 μM . Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas.

Composto	Rb ($\Omega \text{ cm}^2$)	α ($\Omega^{0.5} \text{ cm}$)	Cm ($\mu\text{F/cm}^2$)
Control	2.41 \pm 0.04	2.41 \pm 0.13	2.78 \pm 0.14
Mv3glc	2.46 \pm 0.09	2.59 \pm 0.11	2.60 \pm 0.06
Antocianinas de Vinho Tinto	2.21 \pm 0.29	2.25 \pm 0.22	2.75 \pm 0.13
Cy3glc	2.22 \pm 0.06	2.24 \pm 0.05	2.81 \pm 0.06
Antocianinas de Amora	2.29 \pm 0.08	2.57 \pm 0.12	2.55 \pm 0.05

Estes resultados complementam aqueles obtidos no ensaio de SRB e é relevante já que a aplicação destes metabolitos em formulações cosméticas tem de ter garantida a segurança no seu uso, isto é, que não sejam tóxicos para as células sobre as quais serão aplicados e que não alterem o seu ciclo celular em células em proliferação.

1.6. Efeito dos pigmentos antociânicos nos micromovimentos celulares

Por forma a melhor compreender o efeito das antocianinas na camada celular mais externa da pele, efetuaram-se medições dos micromovimentos celulares de uma monocamada de células HaCat em cultura e após incubação com os extratos/pigmentos durante 24 horas, quando os valores de impedância não apresentavam oscilações de grande amplitude, mas estava presente um certo ruído no sinal. Este pode ser interpretado com um maior número de leituras, medidas a cada segundo. Assim, as medições foram realizadas a uma frequência de 4 kHz e as flutuações nos valores de resistência foram analisados por normalização desses valores à média dos valores de resistência do período de medição (Figura 21). Verifica-se que os extratos antociânicos e os pigmentos isolados não apresentam um desvio drástico relativamente aos poços controlo, tendo sido mantidas as flutuações nos valores de resistência ao longo do tempo de medição, ainda que com um aparente decréscimo na presença dos compostos. Para melhor compreender estes resultados, as flutuações nos valores de resistência podem ser matematicamente analisadas recorrendo a três diferentes métodos numéricos: a transformada de Fourier (FFT), a variância e a variância de incrementos.

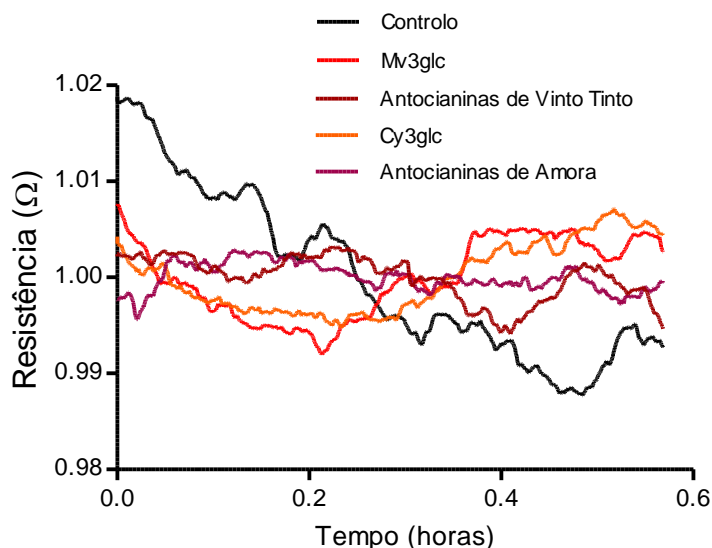


Figura 21. Valores de resistência normalizados ($\frac{R_n}{R_{média}}$) e obtidos após 24 horas de incubação de células HaCat com os compostos ou apenas com meio de cultura (controlo). As medições foram realizadas para obtenção de 2048 pontos para cada poço, sendo que se realizaram medições de 5 amostras/s e, portanto, 410 s/poço.

O sumário dos resultados obtidos é expresso como um único valor para cada parâmetro calculado através dos três diferentes métodos (Tabela 7). A segunda coluna apresenta a média dos valores de resistência para o período de 2048-segundos.

Tabela 7. Análise dos resultados dos ensaios de micromovimentos realizados com uma monocamada de células HaCat 24 horas após incubação com os extratos antociânicos e as suas antocianinas maioritárias a uma concentração de 20 μ M. A coluna de 'Resistência' representa a média dos valores de resistência ao longo da medição de 2048 pontos. A coluna referente ao 'Power Slope' é o declive da regressão linear dos mínimos quadrados do gráfico log-log do espectro de potências. A coluna Var32 é a variância estatística para os valores representantes dos intervalos de 32 pontos. A coluna Voi32 refere-se à variância de incrementos para os intervalos de 32 pontos do conjunto de 2048-s. A coluna dos valores de Hurst diz respeito ao expoente de Hurst. Os valores são apresentados como a média \pm desvio padrão (n= 4-7 para cada composto).

Composto	Resistência (k Ω)	Power slope	Var32 (10^{-7})	Voi32 (10^{-2})	Hurst
Controlo	9.11 \pm 0.46	2.14 \pm 0.10	3.24 \pm 0.63	1.19 \pm 0.007	0.870 \pm 0.123
Mv3glc	1.0.24 \pm 0.84	2.22 \pm 0.14	5.68 \pm 1.40	1.31 \pm 0.003	0.997 \pm 0.002
Antocianinas de Vinho Tinto	8.36 \pm 0.49	2.06 \pm 0.13	2.39 \pm 0.36	1.14 \pm 0.008	1.001 \pm 0.002
Cy3glc	9.10 \pm 0.30	2.07 \pm 0.19	2.32 \pm 0.65	1.26 \pm 0.005	0.997 \pm 0.003
Antocianinas de Amora	9.72 \pm 0.12	2.08 \pm 0.13	2.80 \pm 0.66	1.34 \pm 0.002	1.001 \pm 0.001

Na coluna do *Power Slope* apresentam-se os declives obtidos pela regressão linear aplicada à função dos mínimos quadrados (nos primeiros 100 pontos), a partir do gráfico log-log do *Power Spectrum*, isto é, da representação gráfica da transformada de

Fourier. Na coluna Var32 estão presentes as médias dos valores de variância para cada intervalo de 32 pontos e na coluna Voi32 apresentam-se as médias dos valores da variância de incrementos para intervalos de 32 pontos, considerando que as medições foram realizadas de 32 em 32 segundos e que, portanto, se obtiveram, 63 incrementos. São ainda apresentados os valores do expoente de Hurst, calculado como declive da regressão linear aplicada aos dados experimentais dos valores da variância de incrementos.

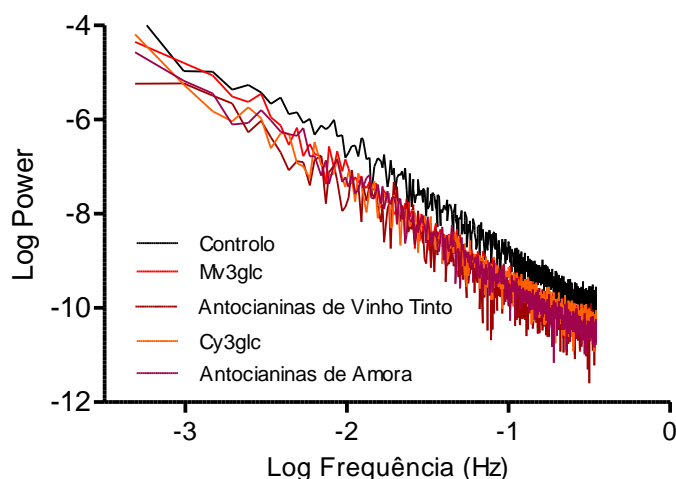


Figura 22. Transformada de Fourier aplicada a leituras de resistência a 4 kHz de uma monocamada de células HaCat expostas a diferentes fontes antociânicas (extratos de vinho tinto e de amora, e antocianinas isoladas Mv3glc e Cy3glc) a uma concentração de 20 μ M. Cada curva consiste num conjunto de 2048 pontos medido a intervalos de um segundo.

Na Figura 22 apresenta-se a representação gráfica da transformada de Fourier aplicada aos valores de resistência medidos no intervalo de 2048 segundos para cada poço. Esta transformada foi aplicada para que se pudesse analisar mais facilmente o sinal de ruído, isto é, as pequenas flutuações nos valores de resistência, como um único valor. Isto é, como o declive da regressão linear dos mínimos quadrados do espectro de potências. Por observação dos valores deste declive na Tabela 7 verifica-se que a presença de antocianinas não influenciou o sinal de resistência, pois não foram verificadas diferenças significativas. A representação gráfica dos valores de variância estatística e da variância de incrementos em função do logaritmo da sequência temporal explorada (isto é o logaritmo de cada um dos intervalos de variância calculados) na Figura 23, permite-nos compreender que há uma aparente diferença nos valores de variância para intervalos maiores. Contudo, quando analisamos a variância e variância de incrementos de intervalos mais curtos, esta aparente diferença é abolida e, de facto, quando se observa o valor da média para os intervalos de 32 pontos (Tabela 6), não se encontram diferenças estatísticas nestes valores.

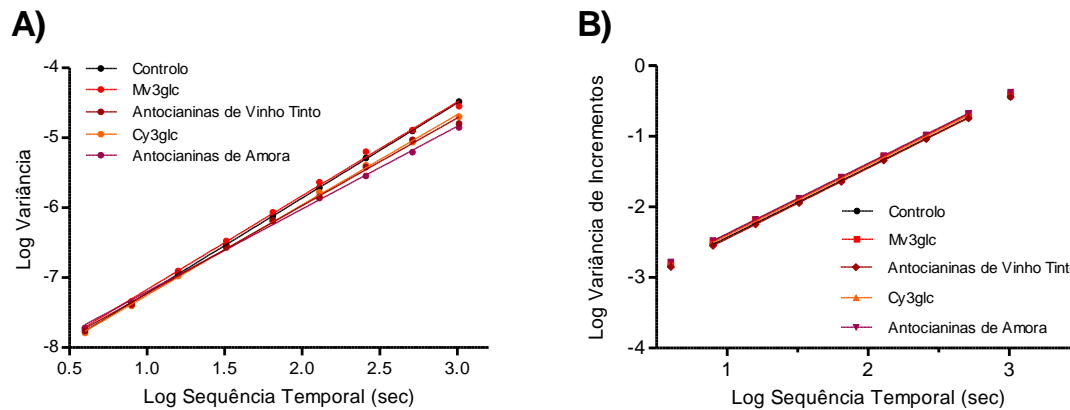


Figura 23. Análise da variância (A) e da variância de incrementos (B) dos valores de resistências medidos para células HaCat em monocamada quando expostas a diversas fontes antociânicas (extratos de vinho tinto e de amora, e antocianinas isoladas mv3glc e cy3glc) a uma concentração de 20 μ M. Cada curva consiste num conjunto de 2048 pontos medidos a intervalos de um segundo.

Considerando o conjunto de resultados obtidos a partir dos três diferentes métodos numéricos, pode-se concluir que nem os extratos antociânicos mais complexos, nem os seus constituintes maioritários isolados, apresentam citotoxicidade para esta linha celular, no que diz respeito à análise dos seus micromovimentos, já que não foram encontradas diferenças estatísticas nos valores calculados de *power slope*, de variância e de variância de incrementos.

1.7. Ensaios de *Wound-Healing*

É importante considerar ensaios de *wound-healing* quando pensamos em cuidados da pele, já que a pele é a primeira barreira contra danos externos, como sejam danos mecânicos e, desta forma, um cuidado diário por aplicação de uma formulação com bioativos que promovam a regeneração do tecido celular em caso de pequenos danos pode ser relevante para a promoção de uma pele saudável. Desta maneira, foram realizados ensaios de *wounding* recorrendo ao Sistema ECIS de modo a avaliar o efeito de antocianinas no processo de cicatrização de uma monocamada de queratinócitos. Este sistema apresenta vantagens face aos ensaios tradicionais como é o caso dos ensaios de *scratch*, já que, utilizando o sistema ECIS, o dano é realizado por aplicação de um pulso elétrico de elevada frequência e a recuperação do dano é seguido em tempo real através da medição da impedância, o que torna o ensaio reproduzível.

O dano elétrico foi, então, realizado após incubação durante 24 horas da monocamada de células HaCat com os compostos, por aplicação de uma frequência elevada de 60 000 Hz e uma corrente de 2400 μ A, capaz de causar dano na monocamada, o que resultou numa drástica descida nos valores de impedância, para

valores próximos daqueles de um eléctrodo livre de células. Após aplicação do dano, as células em torno do microeléctrodo, começam a migrar e a proliferar fixando-se sobre o eléctrodo. Na Figura 24 - A) está representada a parte resistiva da impedância em função do tempo, onde é clara a influência os extratos antociânicos e das antocianinas isoladas na recuperação do dano. De facto, o tempo que as células demoram a migrar e a proliferar é encurtado na presença de antocianinas. Este fenómeno pode ser quantificado como a diferença de resistência a diferentes tempos ao longo do processo de recuperação do dano (Figura 24 - B), sendo que se verificam diferenças significativas 5 horas após aplicação do dano, no caso do extrato de antocianinas de amora e da sua antocianina maioritária, cy3glc. Dez horas após o dano, há uma diferença significativa na diferença dos valores de resistência para a mv3glc em comparação com as células na situação controlo, sendo que, após esse tempo, os valores de resistência para os compostos e extratos atingem um *plateau*, tal como acontece para os poços correspondentes ao controlo. Às 15 horas após o dano, todos os poços se encontram novamente em confluência.

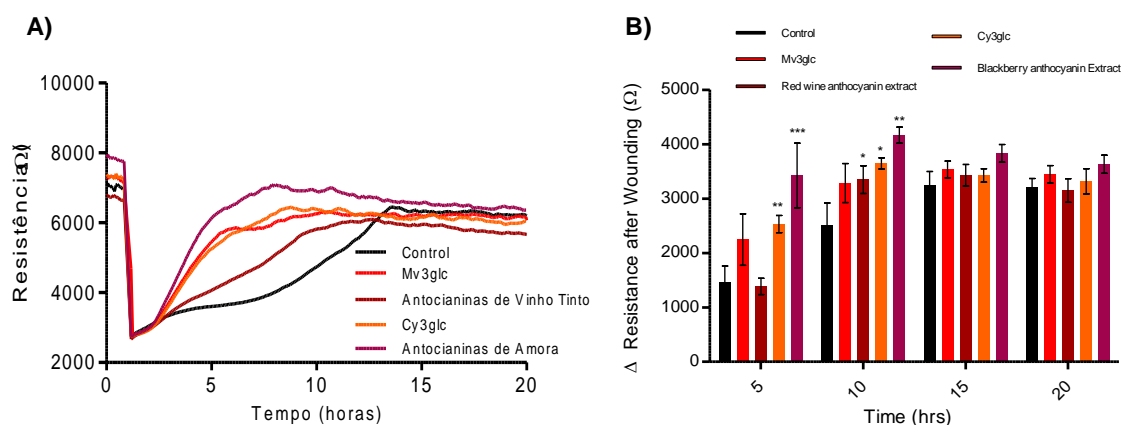


Figura 24. Ensaio de *wound-healing* em tempo-real com células HaCat utilizando o sistema ECIS. **A)** Representação dos valores de resistência após indução do dano elétrico em resposta à incubação com os extratos de antocianinas de vinho e amora, assim como às antocianinas isoladas mv3glc e cy3glc, para uma concentração de 20 μ M. **B)** Representação gráfica das diferenças em resistência a diferentes tempos após o dano. Cada valor representa a média \pm SEM ($n=4-5$) * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ (aumento significativo vs controlo).

Por outro lado, a recuperação do dano pode ser analisada considerando a parte capacitiva da impedância. O tempo de 50 % de recuperação foi calculado a partir do gráfico que representa dos valores de capacitância em função do tempo (Figura 25 - A), modelando os valores de capacitância como % dos valores iniciais, imediatamente após o dano. Foram encontradas diferenças estatísticas quer para os extratos quer para as duas antocianinas (Figura 25 - B). Enquanto que no controlo as células demoram 4,91 (\pm 1,11) horas a recuperar 50 % da área do eléctrodo, os poços incubados com Cy3glc

demonstraram os melhores resultados, sendo que as células demoraram apenas 1.48 (\pm 0.15) horas a recuperar a mesma % de área, seguida pelo extrato antociânico de amora, tendo demorado 2.01 (\pm 0.18) horas. Por outro lado, as células HaCat demoraram 2.03 (\pm 0.09) horas a recuperar 50 % do dano, na presença de Mv3glc e, por fim, 2.36 (\pm 0.76) quando expostas a extrato antociânico de vinho.

Conjuntamente, estes resultados indicam que as antocianinas do vinho tinto e das amoras, particularmente a Mv3glc e a Cy3glc, são potenciais ingredientes de interesse para formulações cosméticas que podem efetivamente ajudar ao tratamento de pequenas feridas a que a pele está habitualmente sujeita por ser a barreira mais externa em contacto com todos os fatores do meio ambiente. Contudo, são necessários mais estudos que considerem a presença dos restantes tipos celulares que compõe este órgão e ainda o ambiente em que o processo ocorre e que pode ter elevada influência nas vias e na sequência de eventos que promove a cicatrização, nomeadamente o estado de inflamação localizada que poderá ocorrer.

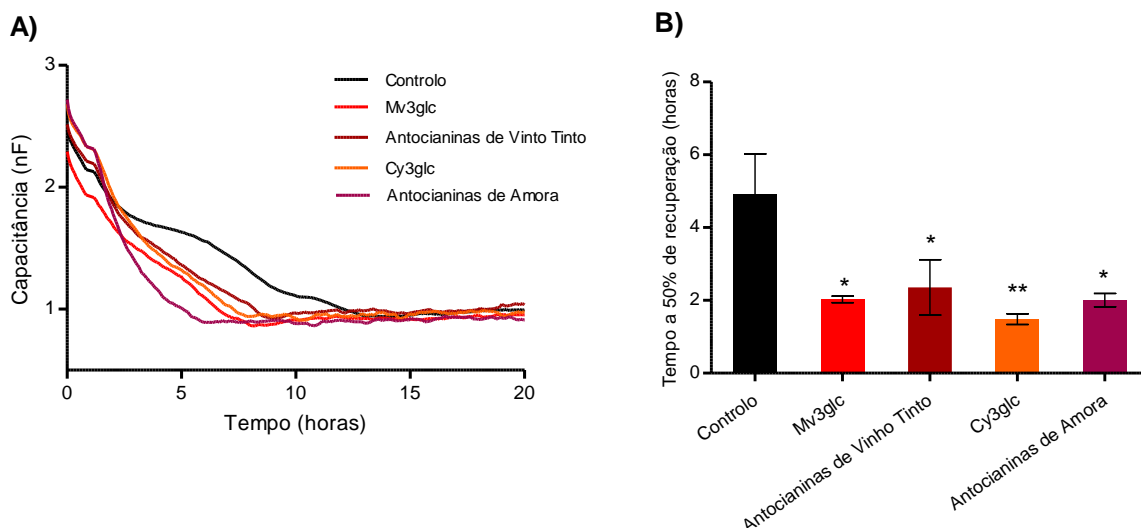


Figura 25. Ensaio de wound-healing com células HaCat realizado com o sistema ECIS. A) Representação gráfica dos valores de capacitância em função do tempo, a partir do momento em que o dano foi induzido (tempo 0 horas) em resposta à incubação com extratos antociânicos de vinho tinto e de amora, assim como de antocianinas isoladas, Mv3glc e Cy3glc, para uma concentração de 20 μ M. B) Tempo necessário para que as células recuperem 50% do dano, na presença de meio de cultura DMEM-F12 (controlo) ou na presença dos compostos antociânicos. Cada valor representa a média \pm SEM (n=4-5) *p < 0.05, ** p < 0.01 (decrécimo significativo vs controlo).

As antocianinas podem ser extraídas de diversas fontes alimentares, como é o caso do vinho e das amoras. Um dos motivos da realização deste trabalho é o facto de que as antocianinas podem ser obtidas a partir de resíduos industriais que, tal como o nome indica, não teriam outro valor económico e, desta forma, poder-se explorar as inúmeras propriedades biológicas dos pigmentos com vista ao cuidado da pele. No caso das amoras, é de saber que 10 % de toda a produção é composto por frutos que não vão para venda, por serem a chamada “fruta-feia” [129]. Esta fonte ainda rica em antocianinas poderá ser uma excelente fonte industrial para a extração destes metabolitos. Por outro lado, o vinho, como matriz complexa e rica em diversos grupos de polifenóis pode ter interesse económico na medida em que da indústria resultam resíduos com potencial valor comercial, como é o caso do mosto, ainda muito rico em antocianinas e que pode ser usado para a sua extração [130]. Assim, a extração, purificação e caracterização de dois extratos antociânicos foi realizada para uso em posteriores ensaios biológicos importantes para a compreensão das potenciais propriedades com interesse para a indústria cosmética. Assim, foi obtido um extrato antociânico de vinho, contendo Mv3glc, Dp3glc, Pt3glc e Pn3glc, e purificou-se o seu pigmento mais abundante (Mv3glc). Obteve-se ainda um extrato de antocianinas de amora rico em Cy3glc, que foi também isolada, contendo também outros derivados da cianidina. Com estas duas fontes antociânicas ricas em diferentes pigmentos, realizaram-se ensaios de atividade antiproliferativa até uma concentração de 100 μM , concluindo-se que, até à concentração testada, os pigmentos poderiam ser utilizados em testes posteriores, com a ressalva do uso do extrato de amora que a essa concentração demonstrou alguma citotoxicidade.

Relativamente aos ensaios de citotoxicidade realizados com recurso ao sistema ECIS, pôde-se concluir que, para a concentração testada de 20 μM , os extratos e os pigmentos isolados não provocam danos aos queratinócitos. Isto pôde ser comprovado não só pela análise mais generalista dos valores de resistência ao longo do tempo, mas também pelos parâmetros calculados a partir do modelo do ECIS (R_b , α e C_m), referentes às interações entre células e entre as células e a matriz, assim como em relação à função de membrana, notando, mais uma vez, que estes só podem ser calculados quando a monocamada está intacta e não quando esta se encontra danificada (como aconteceu no caso das concentrações mais elevadas de DMSO). Ainda que não se tenham encontrado diferenças entre os parâmetros calculados, é de notar que os valores obtidos para o controlo não mostram similaridade àqueles encontrados na literatura [131] para esta linha celular. Enquanto que os valores experimentais de R_b e α obtidos foram em torno de 2.40 $\Omega\text{ cm}^2$, está reportado um valor de R_b de 1.20 $\Omega\text{ cm}^2$ e um valor de α de 5.00 $\Omega^{0.5}\text{ cm}$. Por outro lado, a literatura indica um valor de C_m de 2.00 $\mu\text{F/cm}^2$ para as

células HaCat, sendo que o valor experimental para as condições utilizadas foi de $2.80 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, aproximadamente. Isto poderá ser explicado pelas diferentes condições utilizadas ainda antes da inoculação das células, já que os elétrodos foram pré-tratados com gelatina e que houve um período de adesão e proliferação até à formação de barreira de 24 horas e consequente período de incubação com os compostos de mais 24 horas. Na literatura, contudo, os parâmetros foram calculados 12 horas após terem atingido confluência. Estas pequenas alterações podem contribuir para as diferenças encontradas nos valores obtidos para os três parâmetros calculados.

Por outro lado, explorou-se a técnica de análise dos micromovimentos celulares, já descrito na literatura e especialmente útil para casos em que os compostos poderão interagir com os filamentos do citoesqueleto, como a actina. De facto, esta análise permite compreender o estado geral da célula e tem a vantagem de, através de métodos estatísticos como a variância, se poder quantificar o comportamento das células e, assim, comparar esse comportamento entre o controlo e compostos. No caso estudado dos extratos e pigmentos isolados demonstrou-se que estes não influenciam as células ao nível dos micromovimentos e que, portanto, não interferem com o citoesqueleto.

Realizaram-se ensaios de *wound-healing* com recurso ao sistema ECIS. Os resultados obtidos indicam que as antocianinas interferem com o processo de recuperação de um dano numa monocamada de queratinócitos. É importante considerar que os extratos mantiveram o efeito modelador positivo quando comparados com os seus compostos isolados, já que, considerando a aplicação industrial destes compostos é preciso ter em conta a facilidade na obtenção de tais compostos, sendo, por isso, de maior interesse a obtenção de extratos e não de compostos puros, que requerem processos mais exaustivos que podem comprometer o *scaling up* dos processos e, dessa maneira, a comercialização dos produtos finais. Estes resultados confirmam aqueles encontrados na literatura [132], referentes às antocianinas do feijão de soja preto, composto maioritariamente por Cy3glc, mas também por Dp3glc e Pt3glc (presentes no extrato de antocianinas de vinho) que potenciaram o processo de recuperação num ensaio tradicional de *scratch*. Ainda que estes testes sejam indicativos de que estes flavonóides são capazes de modelar positivamente o processo de cicatrização, este é um fenómeno complexo, dividido em diversas etapas e em que diversos tipos celulares estão envolvidos. Desta maneira, ensaios que contabilizem estas variáveis deverão ser realizados de forma a perceber a verdadeira influência destes metabolitos no processo em causa.

A implementação deste tipo de ensaios no sistema ECIS vem como uma vantagem face aos testes tradicionais, já que permite a avaliação da citotoxicidade em tempo real.

Além disto, é possível a realização destes testes em sequência com outros, como é o caso dos ensaios de *wound-healing*, já que, se a realização destes testes depender da incubação com compostos como neste caso, a citotoxicidade pode ser analisada a partir do registo dos valores de resistência durante o período de incubação, por aplicação do modelo de Giaever e Kesse, e independentemente do dano elétrico realizado no final desse período.

2. Ensaio de atividade enzimática

Tendo em conta a influência de certas enzimas da pele no processo de envelhecimento, nomeadamente da importância de enzimas envolvidas na degradação de compostos da matriz extracelular da derme, assim como da enzima envolvida na formação de melanina, pretendeu-se avaliar o efeito dos pigmentos na atividade de três enzimas essenciais: elastase, collagenase e tirosinase, por forma a compreender a ação destes flavonóides no metabolismo do colagénio, elastina e melanina, e relacionando essa ação com uma possível atividade anti-envelhecimento.

2.1. Inibição da Elastase e da Collagenase

Por forma a perceber o efeito de pigmentos antociânicos em enzimas da pele essenciais à manutenção da matriz de colagénio e elastina, realizaram-se ensaios de inibição enzimática contra a collagenase de *C. histolyticum* e contra a elastase pancreática frequentemente utilizada em ensaios enzimáticos para *screening* de compostos com atividade inibitória. Ao contrário da collagenase encontrada nos tecidos, a enzima de *C. histolyticum* é capaz de catalisar diversas quebras na molécula de colagénio. Recorreu-se, por isso, ao composto sintético FALPGA e monitorizou-se a sua hidrólise por absorção de UV-Vis a 324 nm. Os testes foram realizados para a mesma concentração de composto – 50 µM, mas não de substrato, tendo sido utilizado uma concentração de substrato de 600 µM no caso da elastase e 300 µM no substrato da collagenase. Os resultados dos ensaios enzimáticos são apresentados na Figura 26, com a percentagem de inibição de cada uma das enzimas.

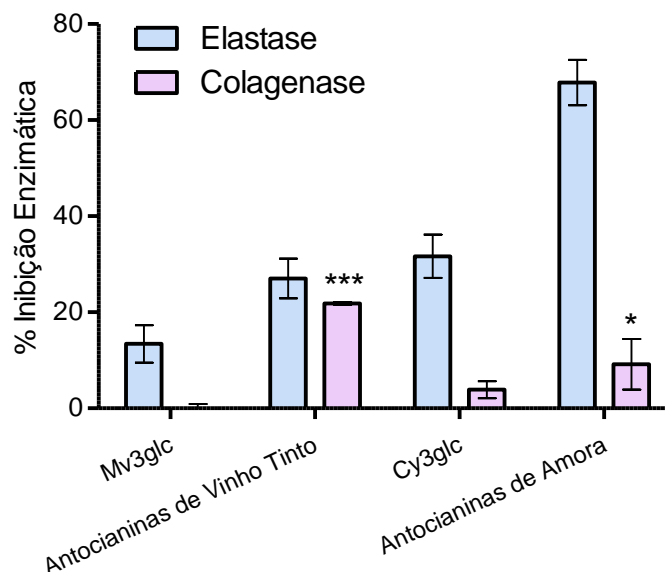


Figura 26. Percentagem de inibição da atividade enzimática da elastase e da colagenase de dois extratos antociânicos de vinho e de amora e dos seus pigmentos maioritários, mv3glc e cy3glc, respetivamente. Os valores representam a média \pm SEM (n=3), *p < 0,05, ***p < 0,001 (valores de absorvância diferentes do controlo).

O que se verificou foi que no caso da elastase os compostos demonstraram possuir uma forte atividade inibitória, tendo em conta a concentração dos extratos e dos pigmentos isolados, 12 vezes inferior à do substrato. O inibidor mais potente aparenta ser o extrato de antocianinas de amora, com aproximadamente 67.82 ± 4.75 % de inibição da atividade enzimática. A cy3glc foi o segundo inibidor mais forte com um grau de inibição de 31.65 ± 4.52 %. O vinho apresentou um grau de inibição de 27.05 ± 4.13 %, enquanto que a sua antocianina maioritária, mv3glc, ainda que tenha inibido a atividade da elastase, fê-lo em menor extensão, apenas com uma extensão de 13.42 ± 3.90 % da atividade da enzima. Por outro lado, quando se observam os resultados obtidos para a colagenase, verifica-se que, ainda que a concentração de substrato tenha sido metade daquela utilizada no caso da elastase, os pigmentos mostraram possuir um efeito muito menor na atividade desta enzima. O extrato de vinho foi aquele que apresentou um maior grau de inibição da enzima (21.82 ± 0.28 %), o que contrastou com a atividade da malvidina-3-glucósido, que não inibiu a colagenase. Isto indica que a atividade inibitória do extrato não dependerá do seu pigmento principal, mas sim dos outros pigmentos aí presentes (Dp3glc, Pt3glc e Pn3glc). Estas antocianinas-3-glucósidos são mais polares que a mv3glc, como se verifica através dos tempos de retenção de cada uma no método de HPLC utilizado, já que a percentagem em solvente B vai aumentando ao longo do tempo e que este é mais apolar que o solvente A, para além disso, ao observar as estruturas químicas representadas na Figura 12, percebe-se que a malvidina-3-glucósido é,

efetivamente a antocianina menos polar, contendo dois grupos metilo e que os restantes pigmentos contêm entre 1 a 3 grupos hidroxilo no anel C. Ainda que não se tenham realizado ensaios de cinética enzimática e que, portanto, não se tenha investigado os tipos de inibição presentes, a estrutura dos pigmentos terá invariavelmente de condicionar essa inibição, neste caso, a presença de grupos hidroxilo livres poderá ser determinante para a interação com o centro ativo ou outra parte da enzima, que está a modelar a sua atividade. Relativamente ao extrato antociânico de amora e à cianidina-3-glucósido, estas apresentaram um grau de inibição semelhante e baixo, com $9,14 \pm 5,27 \%$ e $3,88 \pm 1,76 \%$, respetivamente.

2.2. Inibição da Tirosinase

A tirosinase é uma das enzimas mais importantes da pele, pois é responsável pelo passo limitante da sequência de reações que culmina com a produção de melanina. No entanto, a sua função pode, em diversas situações, estar alterada, provocando um aumento anormal da sua atividade e conduzindo a anomalias de pigmentação, como é o caso da hiperpigmentação. Isto acontece durante o envelhecimento com o aparecimento de manchas irregulares de melanina na pele. Assim, encontrar formas de modular a sua atividade, através de inibidores, poderá ser importante no tratamento deste tipo de disfunção cutânea. Para isto avaliou-se a atividade de pigmentos antociânicos na atividade da tirosinase de cogumelo, utilizando o substrato natural da enzima, L-DOPA. As amostras foram testadas a uma concentração de $50 \mu\text{M}$, enquanto que o substrato foi usado a $500 \mu\text{M}$.

Verificou-se que os pigmentos e os extratos possuem efeito inibitório sobre a tirosinase (Figura 27), sendo que o pigmento maioritário do vinho é capaz de inibir a enzima nestas condições numa extensão de $38,19 \pm 1,69 \%$. O extrato de antocianinas de vinho, por outro lado, apresenta uma inibição menor, de apenas $10,45 \pm 0,98 \%$. Por sua vez o extrato de amora apresenta um grau de inibição de $17,43 \pm 0,78 \%$ e a cy3glc de $12,12 \pm 0,69 \%$.

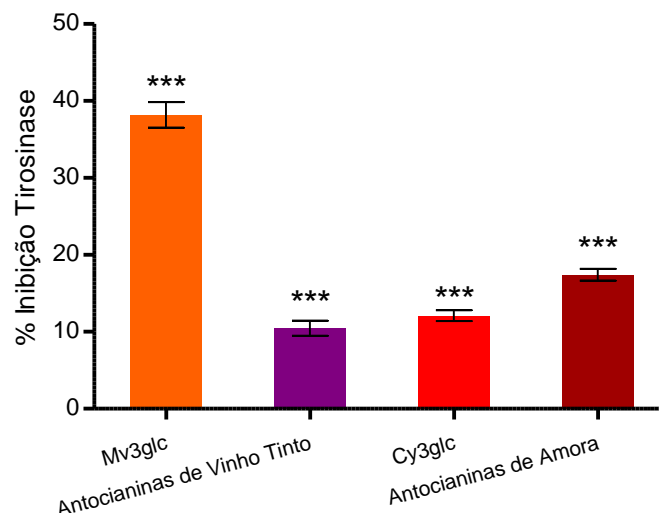


Figura 27. Percentagem de inibição da atividade enzimática da tirosinase de dois extratos antociânicos de vinho e de amora e dos seus pigmentos maioritários, mv3glc e cy3glc, respetivamente. Os valores representam a média \pm SEM (n=3), ***p < 0,001 (diferente do controlo),

Para além do ensaio de inibição enzimática, pretendeu-se ainda explorar o mecanismo por detrás desta inibição. Para isso, realizaram-se ensaios de cinética enzimática para a mesma concentração de inibidor. A partir dos resultados experimentais obtidos, realizou-se um ajuste ao modelo de Michaelis-Menten (Figura 28 - A), por forma a compreender se a enzima respeita o modelo, tal como indicado na literatura [133]. Tendo sido obtidos R^2 pelo *fitting* aplicado superiores a 0.98, validou-se o uso do modelo para análise dos resultados e obteve-se uma curva de Lineweaver-Burk para melhor analisar os dados de cinética. Os compostos apresentam um comportamento típico de um mecanismo competitivo (Figura 28 – B), já que há um desvio das regressões lineares referentes aos inibidores para declives maiores, sendo que estas retas cruzam a reta referente ao substrato no eixo das ordenadas.

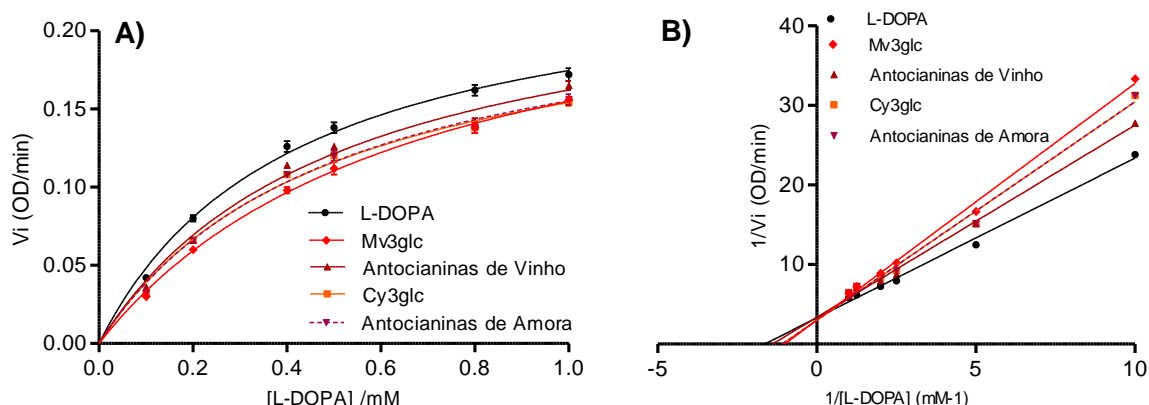


Figura 28. Efeito dos extratos antociânicos de vinho e de amora e dos pigmentos mv3glc e cy3glc na atividade da tirosinase. (A) Representação dos resultados segundo o modelo de Michaelis-Menten e B) Representação de Lineweaver-Burk. ($R^2 > 0,98$; $n=3$)

Desta forma, verifica-se que os valores de V_{max} se mantêm relativamente à cinética realizada para o substrato natural, e que os valores K_m são superiores aos da enzima-substrato (Tabela 8), ainda que estatisticamente apenas o valor referente à mv3glc se tenha mostrado significativo. Isto quer dizer que os compostos estão a interagir com o centro ativo da enzima, tornando-o menos disponível para o substrato, logo, a velocidade máxima não é afetada e consegue ser atingida, mas para que isso aconteça é necessária uma concentração superior de L-DOPA. Os valores obtidos para a percentagem de inibição e o mecanismo de inibição envolvido são complementares, já que os valores de K_m seguem a mesma tendência que os de % de inibição, sendo que na presença de mv3glc é necessária uma maior concentração de substrato para que se atinja a velocidade máxima, seguido pelo extrato de amora, de vinho e, por fim, a cy3glc.

Tabela 8. Parâmetros cinéticos calculados a partir da modelação de Michaelis-Menten para a reação catalisada pela tirosinase, na presença e na ausência de pigmentos. K_m – constante de Michaelis-Menten; V_{max} – velocidade máxima da reação. Apresentam-se os valores da média \pm SEM e realizaram-se os ensaios em triplicado ($n=3$).

Composto	K_m (μM)	V_{max} (abs/min)
L-DOPA	410.0 \pm 40.0	0.25 \pm 0.01
Mv3glc	680.0 \pm 50.0 ^a	0.26 \pm 0.01
Extrato de Vinho	500.0 \pm 60.0	0.24 \pm 0.01
Cy3glc	490.0 \pm 50.0	0.23 \pm 0.01
Extrato de Amora	500.0 \pm 50.0	0.23 \pm 0.01

^a – p^{***} - one-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni, com $p < 0.001$

A modelação da atividade de algumas enzimas da pele pode ser um ponto de viragem no tratamento dos sintomas do envelhecimento da pele, nomeadamente, do envelhecimento precoce. Entre elas, a colagenase e a elastase têm funções fundamentais na manutenção da matriz extracelular do órgão, que garante as propriedades rígidas e elásticas da pele. Tendo em conta as inúmeras atividades biológicas das antocianinas já descritas na literatura (propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, etc.), o estudo do seu efeito sobre estas enzimas é relevante na medida em que estes pigmentos naturais poderão ser utilizados em formulações cosméticas como adjuvantes de anti-envelhecimento. Assim, através de ensaios enzimáticos com as enzimas enunciadas e os seus respetivos substratos, verificou-se a capacidade inibitória contra ambas as enzimas, sendo que a elastase foi inibida em muito maior extensão do que a colagenase. Note-se que os derivados de cianidina mostraram ser inibidores mais potentes da elastase. Ainda que não tenham sido estudados os mecanismos de inibição e, por isso, não se saiba que tipo de modelação está a ocorrer em cada um dos casos (modelação do centro ativo ou de outra zona da enzima), pode-se sugerir, no entanto, que parece haver uma tendência para os compostos mais polares interagirem mais com a enzima, inibindo-a. Isto porque, da gama de pigmentos presentes no vinho e amora, a mv3glc é o composto mais apolar, contendo dois grupos metilo substituídos no anel C, e é o que apresenta menor efeito na atividade da elastase. Por outro lado, os resultados obtidos para a colagenase mostram que o vinho é o inibidor mais forte, enquanto que o seu pigmento principal não inibe a enzima. Desta maneira haverá alguma especificidade de outro pigmento aí presente, ainda que em menor quantidade, para a enzima que catalisa a quebra das fibras de colagénio. Estes resultados foram testados a pH fisiológico e, portanto, dependeram das espécies antociânicas em equilíbrio em solução a esse pH.

Assim, estes resultados mostram que estes flavonóides poderão ser utilizados em formulações cosméticas com vista ao tratamento dos sintomas do envelhecimento precoce, nomeadamente ao aparecimento de rugas. Estes resultados vêm completar aqueles encontrados na literatura que exploram o efeito de outros polifenóis, nomeadamente de outros flavonóides, como a catequina, na atividade das enzimas referidas [86]. Estudos com vagem de cacau, rica em diferentes flavonóides, nomeadamente em derivados de flavonas mostraram ser capazes de inibir a atividade destas enzimas [134]. Outro estudo que avalia o efeito de diversos derivados de flavonas e flavonóis na ação da colagenase, refere que, de uma forma geral, os flavonóis demonstraram ser inibidores mais potentes que as flavonas [135]. Contudo, a literatura disponível sobre o efeito das antocianinas nestas enzimas é escassa e estes resultados vêm acrescentar informação pertinente sobre a bioatividade destes pigmentos.

Por outro lado, a influência dos pigmentos antociânicos na atividade da tirosinase foi também estudada. Esta enzima é essencial à formação de melanina, o pigmento castanho que protege a pele da radiação UV. Contudo, a produção deste composto pode estar desregulada no envelhecimento, provocando o aparecimento de manchas de melanina anormais. Esta é um sintoma estético não desejável e, por isso, a modelação da atividade da tirosinase, nomeadamente, a investigação de inibidores da sua atividade pode ser um método de tratamento. Desta maneira, realizaram-se ensaios de cinética e inibição enzimática por forma a explorar o efeito das antocianinas de vinho e amora sobre a reação de oxidação do L-DOPA catalisada pela tirosinase. Verificou-se, então, que os pigmentos encontrados no vinho tinto e na amora são capazes de inibir a atividade da tirosinase, sendo que a mv3glc apresentou o maior grau de inibição e o parâmetro cinético de K_m mais elevado, sendo, pois, o inibidor mais potente do conjunto estudado. Mostrou-se ainda que quer os extratos, quer as antocianinas isoladas apresentam um tipo de mecanismo de inibição competitivo, que é o mais comum na natureza. Os resultados obtidos para o extrato de vinho estão de acordo com a literatura [136], em que 100 mg/L de uma fração de antocianinas de vinho apresentou uma inibição de aproximadamente 20 % da atividade da tirosinase. Por outro lado, está também descrito que a cy3glc é capaz de inibir a tirosinase e em maior extensão que a delphinidina-3-glucósido (presente no vinho tinto) e que a pelargonidina-3-glucósido [137].

A conjugação destes resultados mostra que as antocianinas de vinho e de amora possuem efeito inibidor na atividade de algumas das enzimas importantes no bem-estar da pele. É também de notar a aparente especificidade existente na relação antocianina-enzima inibida. Note-se por exemplo que o inibidor mais forte da elastase é o extrato de antocianinas de amora, contudo, no caso da collagenase, o inibidor mais potente é o extrato de vinho tinto, ainda que o seu pigmento maioritário isolado não apresente qualquer atividade. Por outro lado, no que diz respeito à atividade da tirosinase, verificou-se que é a mv3glc o pigmento com mais atividade. Estas diferenças são importantes se o objetivo de uma formulação for específico. Isto é, se se pretender uma formulação cujo objetivo é o de travar o aparecimento de rugas, poderá ser interessante conjugar os extratos de antocianinas de vinho e de amora e obter um efeito conjugado quer sobre a atividade da collagenase que sobre a elastase, no caso de se verificar sinergia. Por outro lado, se o objetivo principal for o tratamento da hiperpigmentação, uma formulação rica no pigmento malvidina-3-glucósido poderá apresentar efeitos mais relevantes do que um que possua o extrato de vinho, ou um rico em derivados de cy3glc. Desta forma, este tipo de abordagem pode contribuir para o desenvolvimento de uma linha de tratamento cosmético com diferentes populações alvo.

3. Novos derivados acilados de antocianinas

Considerando o facto de as antocianinas serem compostos hidrossolúveis e de que grande parte das formulações cosméticas ser caracterizada por uma matriz lipofílica, pretendeu-se sintetizar novos derivados destes pigmentos por adição de uma cadeia carbonada, por forma uma gama de compostos mais lipofílicos e cuja bioatividade deverá ser estudada e comparada com a antocianina original.

3.1. Caracterização dos derivados acilados por HPLC e LC-MS

A síntese de sete derivados acilados da mv3glc foi realizada por catálise enzimática em 2-metil-2-butanol anidro e a 60 °C, sendo que a quantidade de filtros moleculares e enzima estão de acordo com a literatura [117] (Figura 29). Os ácidos gordos utilizados para a obtenção de diversos derivados foram: ácido butírico (C4), ácido hexanóico (C6), ácido cáprico (C8), ácido decanóico (C10), ácido láurico (C12), ácido mirístico (C14) e ácido palmítico (C16).

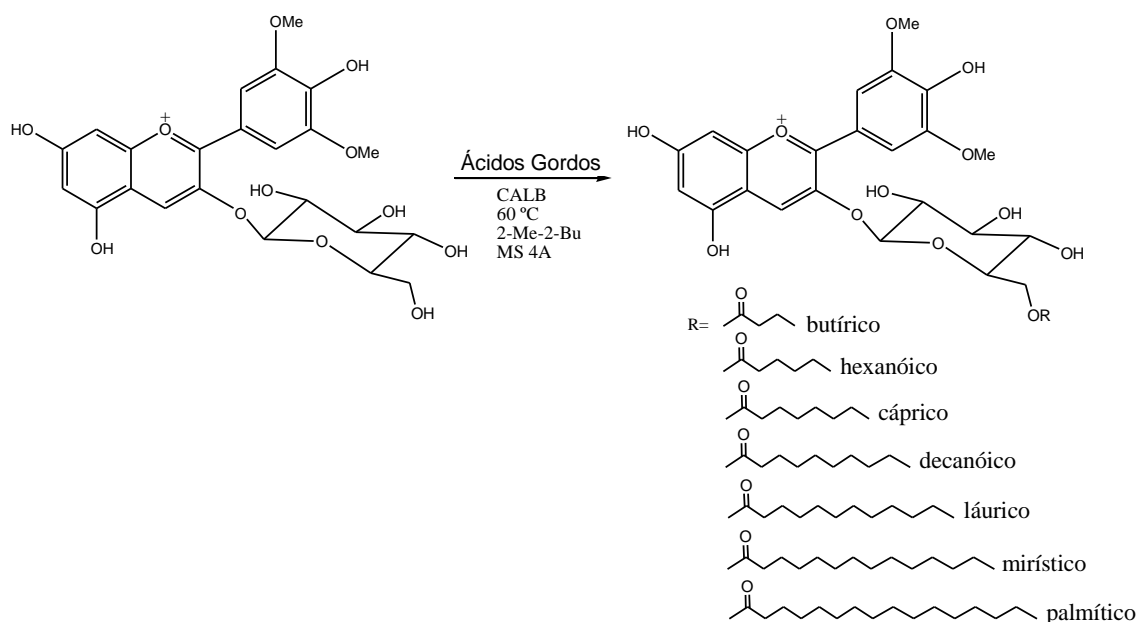


Figura 29. Esquema reacional da esterificação da Mv3glc com diversos ácidos gordos, por via enzimática catalisada pela lipase B de *C. Antarctica*.

As reações foram seguidas por HPLC-DAD e a formação dos produtos esperados foi observada através do novo pico detetado (Figura 30), sendo que os tempos ótimos de reação foram previamente calculados e atingidos entre as 6 horas (para o C4) e as 12 horas (para o C16).

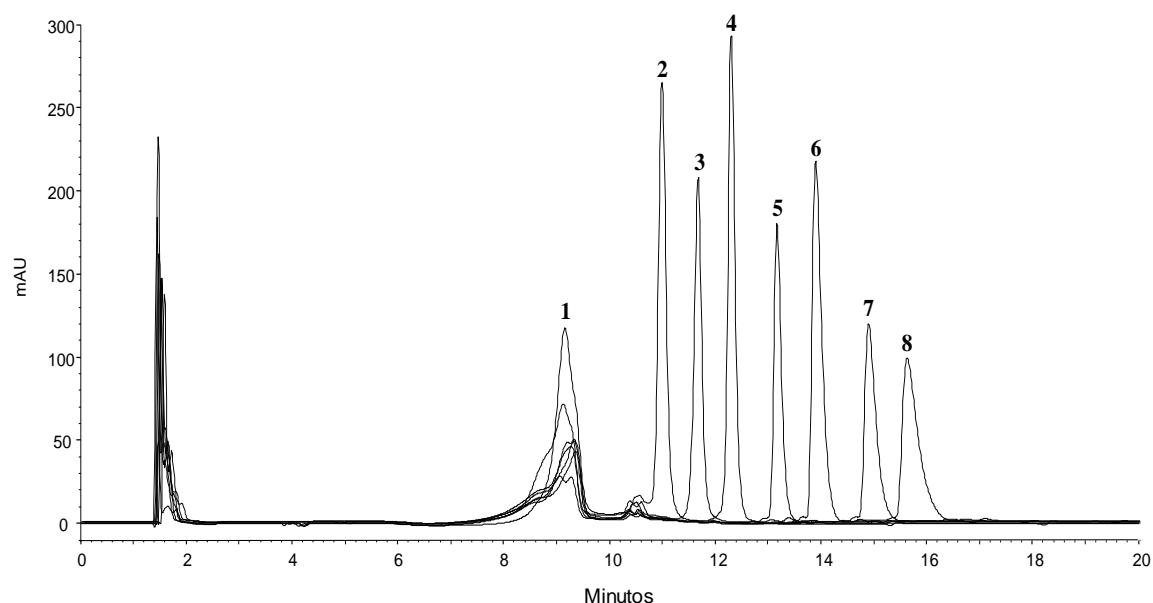


Figura 30. Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC-DAD dos produtos das diferentes reações enzimáticas de esterificação da mv3glc, obtidos ao comprimento de onda máximo e representativos da conversão máxima para cada derivado acilado.

As reações foram ainda analisadas por LC-MS/ESI-MS, em modo positivo (Tabela 9). Os iões moleculares dos picos cromatográficos corresponderam aos respetivos conjugados de mv3glc com o ácido gordo, sendo que as fragmentações indicaram que a esterificação ocorre no resíduo de glucose, o que era de esperar já que a reação catalisada pela enzima é regioseletiva para o grupo hidroxilo do açúcar, sendo esta lipase seletiva para álcoois primários. Esta seletividade foi demonstrada por RMN para o caso do éster de mv3glc-C18 (mv3glc esterificada com o ácido oleico), como descrito na literatura [117].

Tabela 9 – Tempos de retenção na análise por HPLC e resultados obtidos na análise por massa da malvidina 3-glucósido, **1**, e dos seus derivados ésteres, **2-8**.

Composto	MM (g/mol)	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	η (%) ^a	[M] ⁺ m/z	MS ² m/z	MS ³ m/z
Mv3glc, 1	528	9.1	525	-	493	331 (-162)	315 (-162-16)
Mv3glc-C4, 2	598	11.0	530	40	563	331 (-232)	315 (-232-16)
Mv3glc-C6, 3	626	11.8	533	27	591	331 (-260)	315 (-260-16)
Mv3glc-C8, 4	654	12.4	535	40	619	331 (-288)	315 (-288-16)
Mv3glc-C10, 5	682	13.2	536	30	647	331 (-316)	315 (-316-16)
Mv3glc-C12, 6	710	13.9	537	35	675	331 (-344)	315 (-344-16)
Mv3glc-C14, 7	738	14.9	537	24	703	331 (-372)	315 (-372-16)
Mv3glc-C16, 8	766	15.7	537	22	731	331 (-400)	315 (-400-16)

^a – Após purificação por cromatografia em coluna.

Numa nota final desta secção, é de notar que foram já sintetizados compostos lipofílicos de cy3glc, contudo, quando se alterou a quantidade de reagentes por forma a aumentar o rendimento das reações, verificou-se que a extração líquido-líquido com heptano não foi suficiente para retirar o reagente do produto final e, dessa forma, é necessário otimizar a purificação destes novos compostos para caracterização e consequente avaliação das suas propriedades biológicas.

3.2. Atividade Antioxidante

Uma das propriedades mais associadas às antocianinas é o seu poder antioxidante. Diversos estudos relacionam a acilação de polifenóis com uma melhoria dessa propriedade [138]. Desta maneira, e tendo em conta a estrutura dos novos derivados de mv3glc, realizaram-se ensaios de peroxidação lipídica de modo a avaliar de que maneira a acilação da estrutura original influencia o poder antioxidantes destes metabolitos. Para isso, mediu-se a extensão da peroxidação de vesículas membranares representativas de membranas biológicas (lipossomas), na presença de um composto de referência, Trolox, e na presença dos compostos lipofílicos, por medição do consumo de oxigénio (Figura 31). Os resultados obtidos parecem indicar uma relação entre a capacidade antioxidante e a hidrofobicidade das moléculas, já que com o aumento da cadeia carbonada do ácido gordo esterificado com a mv3glc, ocorre um aumento do poder antioxidante. Isto acontece até ao derivado acilado com ácido octanóico, a partir do qual se verifica uma drástica diminuição deste efeito. Este fenómeno de aumento do poder antioxidante com o aumento da lipofilicidade e consequente diminuição a partir de um determinado ponto de viragem é descrito na literatura como o efeito de “cut-off” e é reportado para emulsões, membranas e células em cultura [139, 140].

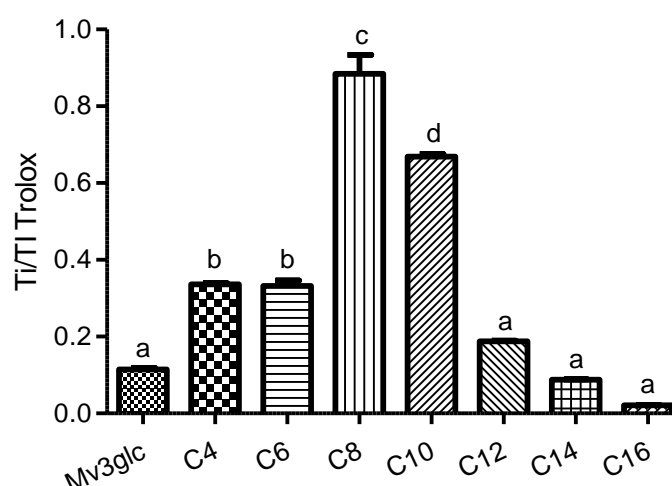


Figura 31. Inibição da oxidação de lipossomas iniciada por AAPH, por medição do consumo de oxigénio para uma concentração de 100 μ M de Mv3glc e dos seus derivados acilados. As colunas representam a média \pm desvio padrão. Colunas com a mesma letra não diferem entre si estatisticamente (*p < 0.05).

Este efeito não linear tem sido explicado pela partição, localização e mobilidade destes antioxidantes num sistema multifásico, como é o caso das emulsões, e que é influenciado quer pela polaridade dos compostos quer pelo seu tamanho. Alguns estudos sugerem que este efeito é sobretudo causado pela mobilidade reduzida (menor difusão) de compostos com grandes cadeias hidrofóbicas, que serão desviados dos centros de interface onde ocorre a oxidação ou que, por outro lado, compostos muito lipofílicos sejam “internalizados” nos centros mais lipofílicos das emulsões (ou até em micelas) e deixem, por isso, de ser capazes de atuar como antioxidantes [139]. Outros estudos, sugerem ainda que estes compostos tendem a agregar, sendo retirados da interface de oxidação [140].

3.3. Atividade Antiproliferativa dos derivados acilados

Tendo sido verificado que a capacidade antioxidante dos novos derivados C4-C10 é aumentada em relação à antocianina original, e que esta não é alterada para os derivados com C12 e C14, decidiu-se prosseguir para estudos de outras propriedades, nomeadamente da capacidade antiproliferativa em células normais da pele.

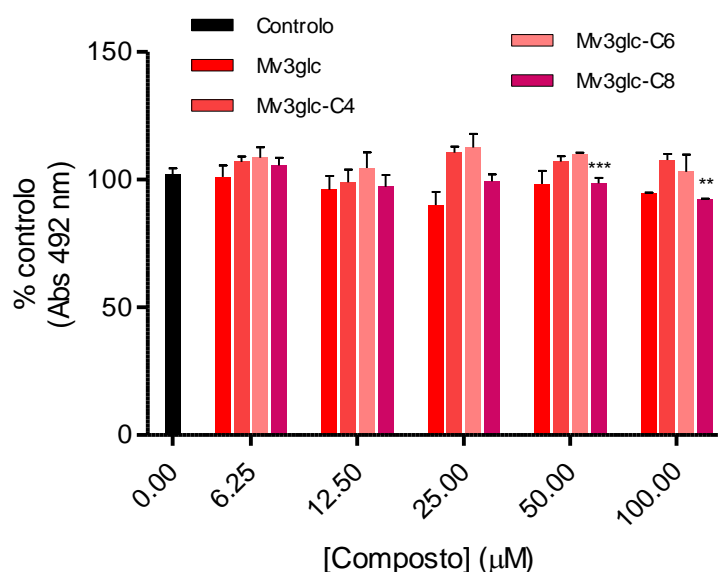


Figura 32. Efeito dos derivados acilados de mv3glc na proliferação de células HaCat, avaliado por ensaio de SRB. As células foram inoculadas em placas de 96 poços e tratadas com uma gama de concentrações de cada composto (6.25 – 100.0 μM), por 48 horas. Cada valor representa a média ± SEM (n=6) *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (diminuição significativa relativamente ao controlo).

Este estudo foi realizado por forma a garantir que estes novos compostos não são tóxicos para as células predominantes da epiderme, de modo a validar estudos posteriores, quer em ensaios mais pormenorizados de citotoxicidade, quer em ensaios de avaliação de propriedades biológicas como efeito no processo de cicatrização ou na

atividade de certas enzimas da pele, como já realizados para o pigmento isolado e para o seu extrato.

Da gama de compostos sintetizados avaliou-se as propriedades antiproliferativas de apenas três: mv3glc esterificada com o ácido butírico (mv3glc-C4), com o ácido hexanóico (mv3glc-C6) e com o ácido octanóico (mv3glc-C8). Esta seleção foi efetuada, em primeiro lugar, devido a problemas na solubilidade dos compostos, já que este tipo de ensaios é realizado na presença de meio de cultura (no caso, RPMI) e que este é um ambiente hidrofílico. Desta maneira, a partir da cadeia carbonada com oito carbonos não foi possível solubilizar os compostos. Por outro lado, como se observou no ensaio de avaliação de atividade antioxidante, o derivado mv3glc-C8 é o que apresenta maior poder antioxidante, sendo que a partir desse número de carbonos a atividade vai diminuindo, logo, os compostos selecionados para o ensaio de SRB serão os que terão mais interesse para o seguimento de ensaios biológicos, se ao facto de serem compostos mais lipofílicos e, portanto, mais facilmente incorporados em emulsões e outras formulações apolares, se aliar a melhoria das suas propriedades químicas, nomeadamente do aumento da sua capacidade antioxidante. Na Figura 32 está representado o efeito dos derivados no crescimento celular das células HaCat. Verificou-se que os compostos não apresentam um efeito antiproliferativo até à concentração de 25.00 μ M. Para as concentrações de 50.00 e 100.00 μ M o derivado acilado mv3glc-C8 inibe o crescimento dos queratinócitos numa extensão de 3.50 e 9.90 %.

Mais uma vez se comprova que o efeito antioxidante não está diretamente relacionado com as propriedades benéficas dos pigmentos, porque, para a mesma concentração, de 100,00 μ M, ainda que o composto com maior cadeia carbonada tenha o maior poder antioxidante, este possui um efeito inibidor em células normais da pele.

As antocianinas são antioxidantes naturais com diversas propriedades biológicas. Contudo, a sua estabilidade é comprometida por diversos fatores como o pH e a temperatura [28]. Para além disto, são metabolitos hidrossolúveis. Desta forma, a obtenção de veículos que as solubilizem e estabilizem em ambientes hidrofóbicos é relevante para a aplicação destes polifenóis em produtos com vista ao cuidado da pele. A estratégia aqui utilizada foi a lipofilização da estrutura original da malvidina-3-glucósido por acilação com ácidos gordos de cadeia carbonada de tamanho variável. Estes novos compostos foram usados em dois diferentes ensaios, por forma a testar as suas propriedades químicas e biológicas. Sete novos compostos (mv3glc esterificada com C4, C6, C8, C10, C12, C14 e C16) foram sintetizados. Estes foram caracterizados por HPLC-DAD e LC-MS/ESI-MS, mostrando que o ácido gordo é esterificado no resíduo de glucose.

A atividade antioxidante foi avaliada por ensaio de peroxidação lipídica. De facto, verificou-se que, para as condições utilizadas, os compostos apresentaram um poder antioxidante superior ao da antocianina original, até ao éster com uma cadeia de oito carbonos. Estes compostos foram, então, selecionados para ensaios biológicos preliminares, nomeadamente de atividade antiproliferativa de queratinócitos, sendo que os compostos não apresentaram uma toxicidade relevante até uma concentração de 100.00 μM . O derivado mv3glc-C8 apresentou alguma atividade antiproliferativa a uma concentração de 50.00 μM , agravada quando se aumentou a concentração para o dobro.

De uma forma geral, os resultados obtidos indicam que a modificação estrutural efetuada melhora as propriedades antioxidantes e que até uma lipofilização com o máximo de uma cadeia de oito carbonos, não é registada uma atividade antiproliferativa capaz de comprometer a viabilidade de queratinócitos em fase exponencial de crescimento.

Para além disto, deve-se ainda notar que a técnica de síntese utilizada recorre à catálise enzimática ao invés de reações químicas, o que é importante para uma futura aplicação industrial para obtenção de novos compostos, não só por ser uma técnica mais verde onde é possível reutilizar o catalisador, tornando o processo mais rentável.

Conclusão

Com este trabalho foi possível estudar algumas propriedades biológicas das antocianinas do vinho e da amora. Tendo sido observado que estes metabolitos não possuem atividade tóxica para queratinócitos em crescimento, até uma concentração de 100.00 μM (com a exceção do extrato de amora para a concentração máxima), pretendeu-se estudar o efeito das antocianinas numa monocamada. Recorrendo ao sistema ECIS, pôde-se otimizar um modelo de monocamada de uma linha celular de queratinócitos, HaCat. A citotoxicidade dos compostos foi avaliada para uma concentração de 20.00 μM e, a partir dos dois tipos de ensaios realizados, foi possível estabelecer protocolos de análise de citotoxicidade que poderão ser genericamente utilizados em trabalhos futuros, não só tendo em vista a análise da citotoxicidade de outros polifenóis em células HaCat, como também de outros compostos, inclusive fármacos cuja citotoxicidade tenha de ser testada em linhas celulares normais para validação da sua utilização. Por outro lado, os ensaios de análise dos parâmetros calculados a partir do modelo de *Giaver e Keese* e de análise dos micromovimentos celulares poderão ser aplicados a outras linhas celulares, uma vez estabelecido o protocolo de cultura e formação de monocamada. No caso estudado, os ensaios de citotoxicidade demonstraram que as antocianinas não são tóxicas para as células mais abundantes da epiderme, o que era de esperar, tendo em conta a legislação aplicada para o consumo destes pigmentos.

Para além disto, a otimização do modelo de monocamada em ECIS permitiu a realização de ensaios de cicatrização, por aplicação de um impulso elétrico de elevada frequência a uma monocamada de células HaCat, causando a morte das células que se encontravam sobre o eletrodo e permitindo que as aquelas que se encontravam em redor migrassem e proliferassem, recuperando o dano causado. Este ensaio permitiu demonstrar que quer os pigmentos isolados quer os extratos de vinho e de amora a partir do qual foram obtidos possuem um efeito positivo na recuperação do dano, modelando de alguma maneira o processo de cicatrização associada a uma única camada de células de queratinócitos em cultura. De facto, o extrato de amora e a cy3glc apresentaram os melhores resultados tendo diminuído mais o tempo de recuperação face ao controlo. Contudo este é um teste a partir do qual não se pode concluir que as antocianinas modelam o fenómeno de cicatrização da pele, já que este é um processo muito complexo que envolve diferentes tipos celulares e diferentes mediadores e agentes de inflamação. Dessa forma, outros testes terão de ser realizados com modelos mais próximos daquele que acontece *in vivo*. No entanto, estes resultados são indicativos de que a incorporação destes antioxidantes naturais em formulações cosméticas de uso diário poderá ser vantajoso, na medida em que estes poderão auxiliar as células na epiderme a recuperar de pequenos danos causados por fatores externos na epiderme.

Para além disto, a realização de ensaios de inibição de algumas enzimas essenciais da pele permitiu demonstrar que estes flavonóides poderão ser utilizados como bioativos em formulações anti-envelhecimento, já que os extratos antociânicos de vinho e de amora, assim como dos pigmentos isolados mv3glc e cy3glc, foram capazes de inibir a atividade das enzimas que degradam os componentes maioritários da matriz extracelular. Por outro lado, outro dos problemas estéticos associados ao envelhecimento é o aparecimento de manchas castanhas irregulares. Assim, investigou-se o efeito dos pigmentos na atividade da tirosinase, enzima catalisadora do passo limitante na produção de melanina, verificando-se que estes são capazes de inibir a sua atividade por um mecanismo de inibição competitiva, sendo que a mv3glc demonstrou ser o inibidor mais forte.

Conjuntamente, estes resultados demonstraram que a incorporação de antocianinas em formulações antirrugas/anti-envelhecimento ou de uso diário para cuidado da pele poderá ter interesse bioquímico e económico. De facto, estes pigmentos são naturais e parecem estar envolvidos em diferentes pontos importantes no tratamento do envelhecimento precoce. Para além disso, estes compostos podem ser obtidos a partir de resíduos industriais e de outras fontes economicamente não valorizadas (como é o caso da “fruta feia” e dos subprodutos vitivinícolas). O facto de ser possível extrair antocianinas de subprodutos da indústria com vista à formulação de novos produtos permite atingir uma economia circular, cada vez mais importante no que diz respeito ao desperdício industrial e tendo em conta a premissa económica essencial de que os recursos são limitados e as necessidades ilimitadas.

Tendo em vista perspetivas futuras de trabalho, o estudo de outros extratos e de outras antocianinas isoladas deverá ser avaliado por forma a relacionar as diversas atividades com a possível estrutura das antocianinas, nomeadamente no que diz respeito à inibição enzimática, revelando ainda os mecanismos de inibição presentes em cada caso, e selecionando os compostos consoante o objetivo final da formulação, já que, como observado para as antocianinas estudadas, diferentes extratos/antocianinas têm diferentes efeitos quer em relação às enzimas de matriz, quer em relação à tirosinase. Isto pode ser de interesse se se considerar, por exemplo, uma formulação cujo objetivo principal é o combate da hiperpigmentação. Nesse caso, deve-se utilizar a mv3glc como bioativo ao invés do extrato de vinho. Se, ao contrário, pensamos numa formulação antirrugas, então uma conjugação dos extratos de vinho e amora poderá ser a melhor solução.

Ainda considerando o objetivo final de incorporação dos pigmentos em formulações cosméticas, esta pode ser dificultada quando se considera a natureza

hidrofílica das antocianinas e a natureza lipofílica da maior parte dos produtos cosméticos. Neste sentido, foram sintetizados derivados mais lipofílicos da malvidina-3-glucósido, com introdução de uma cadeia carbonada de diferentes tamanhos no resíduo de glucose. Esta modificação pode afetar as características físico químicas e a bioatividade do composto. Por forma a verificar as consequências desta modificação, realizaram-se ensaios de atividade antioxidante, tendo-se verificado que a esterificação com uma cadeia até oito carbonos aumentava o poder antioxidante do composto e obtendo-se assim um leque de compostos mais lipofílicos que a antocianina original. Por outro lado, realizou-se ainda um ensaio preliminar de atividade antiproliferativa e verificou-se que a cadeia carbonada não tornava o composto mais tóxico, até uma concentração de 100.00 μM , com exceção da mv3glc-C8 que apresentava já alguma toxicidade a 50.00 μM . Estes resultados são o passo inicial para um conjunto de experiências que devem ser realizadas para explorar a bioatividade destes novos compostos, como sejam o efeito na cicatrização ou estudos de inibição enzimática, por forma a perceber a consequência da incorporação de um grupo de cadeia apolar com tamanho variável no mecanismo de inibição. Por outro lado, a obtenção de novos derivados lipofílicos de outras antocianinas, como da cy3glc (cuja síntese foi já realizada), será também essencial para se obter um leque de compostos com diferentes atividades biológicas e interesse comercial. Para além disto, deve-se ainda estudar a estabilidade destes compostos face à antocianina original, quer num sistema lipofílico (formulação cosmética), quer num sistema aquoso (intracelular), por forma a compreender quais os compostos com mais interesse de serem utilizados em formulações.

De uma forma geral, este trabalho permitiu demonstrar que as antocianinas são bons candidatos a ser utilizados em cosmética, nomeadamente como substituintes de antioxidantes comerciais com atividades biológicas adicionais no tratamento do envelhecimento precoce e no bem-estar da pele. Contudo, é ainda necessário percorrer um longo caminho até estabelecer os benefícios do uso destes pigmentos em cosmética. Para isso, outros estudos estão já a ser realizados, nomeadamente a otimização de um modelo de transporte dos pigmentos através de uma monocamada de queratinócitos. Este modelo será desenvolvido em ECIS e terá como objetivo compreender a cinética de passagem das antocianinas enquanto compostos puros e enquanto extratos mais complexos, para além de se pretender entender de que forma a alteração estrutural da molécula por esterificação com uma cadeia carbonada poderá ser uma mais valia na absorção dos compostos, já que este é um fator determinante no que diz respeito à atuação dos princípios ativos de formulações simples de hidratação, ou mais complexas de anti-envelhecimento. Este será, ainda assim, um modelo simples, que não considera

a complexidade da epiderme e das restantes camadas que compõem a pele e, por isso, seguir-se-á um ensaio de transporte através de pele de orelha de porco e ainda um ensaio de transporte com recurso a um modelo tridimensional de barreira composta por queratinócitos, fibroblastos e colagénio. Estes ensaios terão como objetivo a validação dos ensaios de transporte em monocamada e permitirão concluir acerca dos compostos mais promissores para utilização em cosmética, tendo em conta a sua absorção pela pele, que determinará a extensão da sua ação enquanto bioativo.

Para além destes testes essenciais de transporte, deverão ser realizados outros testes que permitam avaliar outras atividades biológicas como é o caso da absorção da radiação UV, já que este é um ponto-chave na luta contra o envelhecimento precoce. Por outro lado, o papel anti-inflamatório das antocianinas em contexto de dano celular mecânico/sobre-exposição a radiação solar, será também importante de determinar. Por fim, deverão ser também realizados ensaios que considerem a estabilidade dos compostos em formulações cosméticas, sendo que, para isso, a incorporação dos pigmentos/compostos lipofílicos de interesse em diferentes matrizes deverá ser testada por forma a compreender em que ambiente estes metabolitos naturais poderão atuar de forma mais eficaz.

Referências Bibliográficas

1. Goldstein, J. L. and Swain, T., *Changes in tannins in ripening fruits*, Phytochemistry, 1963. 2(4): p. 371-383.
2. Serra Bonvehi, J. and Ventura Coll, F., *Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder*, Food Chemistry, 1997. 60(3): p. 365-370.
3. Harborne, J. B. and Williams, C. A., *Advances in flavonoid research since 1992*, Phytochemistry, 2000. 55(6): p. 481-504.
4. Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Kromhout, D., Hertog, M. G. L., et al., *Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study*, The Lancet, 1993. 342(8878): p. 1007-1011.
5. Pandey, K. B. and Rizvi, S. I., *Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2009. 2(5): p. 270-278.
6. Choi, D.-Y., Lee, Y.-J., Hong, J. T., and Lee, H.-J., *Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease*, Brain Research Bulletin, 2012. 87(2): p. 144-153.
7. Strathearn, K. E., Yousef, G. G., Grace, M. H., Roy, S. L., et al., *Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinson's disease*, Brain Research, 2014. 1555: p. 60-77.
8. Renaud, S. and de Lorgeril, M., *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*, The Lancet, 1992. 339(8808): p. 1523-1526.
9. Szmítko, P. E. and Verma, S., *Red Wine and Your Heart*, Circulation, 2005. 111(2): p. e10-e11.
10. Rice-Evans, C., Miller, N., and Paganga, G., *Antioxidant properties of phenolic compounds*, Trends in Plant Science, 1997. 2(4): p. 152-159.
11. Lu, Y. and Yeap Foo, L., *Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace*, Food Chemistry, 2000. 68(1): p. 81-85.
12. Urquiaga, I. and Leighton, F., *Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress*, Biological Research, 2000. 33: p. 55-64.
13. Li, A.-N., Li, S., Zhang, Y.-J., Xu, X.-R., et al., *Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols*, Nutrients, 2014. 6(12): p. 6020-6047.
14. Di Donato, P., Taurisano, V., Tommonaro, G., Pasquale, V., et al., *Biological Properties of Polyphenols Extracts from Agro Industry's Wastes*, Waste and Biomass Valorization, 2017.

15. Choi, Y., Lee, S. M., Chun, J., Lee, H. B., et al., *Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (Lentinus edodes) mushroom*, Food Chemistry, 2006. 99(2): p. 381-387.
16. Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., et al., *Natural antioxidants from residual sources*, Food Chemistry, 2001. 72(2): p. 145-171.
17. Ross, J. A. and Kasum, C. M., *Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety*, Annual Review of Nutrition, 2002. 22(1): p. 19-34.
18. Kong, J.-M., Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, T.-F., et al., *Analysis and biological activities of anthocyanins*, Phytochemistry, 2003. 64(5): p. 923-933.
19. Andersen, Ø. M., Jordheim, M., Byamukama, R., Mbabazi, A., et al., *Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of Synadenium grantii (Euphorbiaceae)*, Phytochemistry, 2010. 71(13): p. 1558-1563.
20. Bloor, S. J., *A macrocyclic anthocyanin from red/mauve carnation flowers*, Phytochemistry, 1998. 49(1): p. 225-228.
21. Zhao, C.-L., Yu, Y.-Q., Chen, Z.-J., Wen, G.-S., et al., *Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation*, Food Chemistry, 2017. 214: p. 119-128.
22. He, J. and Giusti, M. M., *Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties*, Annual Review of Food Science and Technology, 2010. 1(1): p. 163-187.
23. Wrolstad, R. E., *Anthocyanin Pigments—Bioactivity and Coloring Properties*, Journal of Food Science, 2004. 69(5): p. C419-C425.
24. Giusti, M. M. and Wrolstad, R. E., *Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy*, Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 2001.
25. Lewis, C. E., Walker, J. R. L., and Lancaster, J. E., *Effect of polysaccharides on the colour of anthocyanins*, Food Chemistry, 1995. 54(3): p. 315-319.
26. Jackman, R. L., Yada, R. Y., Tung, M. A., and Speers, R. A., *Anthocyanins as food colorants - A review* Journal of Food Biochemistry, 1987. 11(3): p. 201-247.
27. Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., et al., *Bioavailability of anthocyanins and derivatives*, Journal of Functional Foods, 2014. 7: p. 54-66.
28. Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. d. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., et al., *Chemical studies of anthocyanins: A review*, Food Chemistry, 2009. 113(4): p. 859-871.
29. Fossen, T., Cabrita, L., and Andersen, O. M., *Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region*, Food Chemistry, 1998. 63(4): p. 435-440.

30. Cabrita, L., Fossen, T., and Andersen, Ø. M., *Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions*, Food Chemistry, 2000. 68(1): p. 101-107.
31. Cheminat, A., Brouillard, R., Guerne, P., Bergmann, P., et al., *Cyanidin 3-malonylglucoside in two Echinacea species*, Phytochemistry, 1989. 28(11): p. 3246-3247.
32. Böhm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B., et al., *Falvonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen*, European Journal of Nutrition, 1998. 37(2): p. 147-163.
33. B. Harborne, J. and A. Williams, C., *Anthocyanins and other flavonoids*, Natural Product Reports, 1998. 15(6): p. 631-652.
34. de Pascual-Teresa, S. and Sanchez-Ballesta, M. T., *Anthocyanins: from plant to health*, Phytochemistry Reviews, 2008. 7(2): p. 281-299.
35. Giusti, M. M., Rodríguez-Saona, L. E., Griffin, D., and Wrolstad, R. E., *Electrospray and Tandem Mass Spectroscopy As Tools for Anthocyanin Characterization*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. 47(11): p. 4657-4664.
36. Horbowicz, M., Kosson, R., Grzesiuk, A., and Dębski, H., *Anthocyanins of Fruits and Vegetables - Their Occurrence, Analysis and Role in Human Nutrition*, Vegetable Crops Research Bulletin, 2008. 68: p. 5.
37. Clifford, M. N., *Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000. 80(7): p. 1063-1072.
38. Middleton, E., Kandaswami, C., and Theoharides, T. C., *The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer*, Pharmacological Reviews, 2000. 52(4): p. 673-751.
39. Mazza, G. and Brouillard, R., *The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions*, Phytochemistry, 1990. 29(4): p. 1097-1102.
40. Prior, R. L. and Wu, X., *Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities*, Free Radical Research, 2006. 40(10): p. 1014-1028.
41. Brouillard, R., *The in vivo expression of anthocyanin colour in plants*, Phytochemistry, 1983. 22(6): p. 1311-1323.
42. Kalt, W., McDonald, J. E., Ricker, R. D., and Lu, X., *Anthocyanin content and profile within and among blueberry species*, Canadian Journal of Plant Science, 1999. 79(4): p. 617-623.

43. Lila, M. A., *Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach*, Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2004. 2004(5): p. 306-313.
44. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G., *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*, Free Radical Biology and Medicine, 1996. 20(7): p. 933-956.
45. Mazza, G., Kay, C. D., Cottrell, T., and Holub, B. J., *Absorption of Anthocyanins from Blueberries and Serum Antioxidant Status in Human Subjects*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. 50(26): p. 7731-7737.
46. Wang, H., Cao, G., and Prior, R. L., *Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. 45(2): p. 304-309.
47. Fukumoto, L. R. and Mazza, G., *Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. 48(8): p. 3597-3604.
48. Azevedo, J., Fernandes, I., Faria, A., Oliveira, J., et al., *Antioxidant properties of anthocyanidins, anthocyanidin-3-glucosides and respective portisins*, Food Chemistry, 2010. 119(2): p. 518-523.
49. Seeram, N. P., Momin, R. A., Nair, M. G., and Bourquin, L. D., *Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries*, Phytomedicine, 2001. 8(5): p. 362-369.
50. Youdim, K. A., McDonald, J., Kalt, W., and Joseph, J. A., *Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults*, The Journal of Nutritional Biochemistry, 2002. 13(5): p. 282-288.
51. Wang, J. and Mazza, G., *Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on the Production of Tumor Necrosis Factor α in LPS/IFN- γ -Activated RAW 264.7 Macrophages*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. 50(15): p. 4183-4189.
52. Wang, L.-S. and Stoner, G. D., *Anthocyanins and their role in cancer prevention*, Cancer letters, 2008. 269(2): p. 281-290.
53. Katsube, N., Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, K., et al., *Induction of Apoptosis in Cancer Cells by Bilberry (Vaccinium myrtillus) and the Anthocyanins*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. 51(1): p. 68-75.
54. Fernandes, I., Faria, A., Azevedo, J., Soares, S., et al., *Influence of Anthocyanins, Derivative Pigments and Other Catechol and Pyrogallol-Type Phenolics on Breast*

- Cancer Cell Proliferation*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. 58(6): p. 3785-3792.
55. Galli, R. L., Shukitt-Hale, B., Youdim, K. A., and Joseph, J. A., *Fruit Polyphenolics and Brain Aging*, Annals of the New York Academy of Sciences, 2002. 959(1): p. 128-132.
56. Rice-Evans, C., *Flavonoid Antioxidants*, Current Medicinal Chemistry, 2001. 8(7): p. 797-807.
57. Bors, W., Heller, W., Michel, C., and Saran, M., *[36] Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies*, Methods in Enzymology, 1990. 186: p. 343-355.
58. Narayan, M. S., Akhilender Naidu, K., Ravishankar, G. A., Srinivas, L., et al., *Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation*, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA), 1999. 60(1): p. 1-4.
59. Noda, Y., Kneyuki, T., Igarashi, K., Mori, A., et al., *Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant peels*, Toxicology, 2000. 148(2): p. 119-123.
60. Huang, D., Ou, B., and Prior, R. L., *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. 53(6): p. 1841-1856.
61. Bueno, J. M., Ramos-Escudero, F., Sáez-Plaza, P., Muñoz, A. M., et al., *Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part I: General Considerations Concerning Polyphenols and Flavonoids*, Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2012. 42(2): p. 102-125.
62. Cao, G., Russell, R. M., Lischner, N., and Prior, R. L., *Serum Antioxidant Capacity Is Increased by Consumption of Strawberries, Spinach, Red Wine or Vitamin C in Elderly Women*, The Journal of Nutrition, 1998. 128(12): p. 2383-2390.
63. Alvarez-Suarez, J. M., Dekanski, D., Ristić, S., Radonjić, N. V., et al., *Strawberry Polyphenols Attenuate Ethanol-Induced Gastric Lesions in Rats by Activation of Antioxidant Enzymes and Attenuation of MDA Increase*, PLOS ONE, 2011. 6(10): p. e25878.
64. Divya, S. P., Wang, X., Pratheeshkumar, P., Son, Y.-O., et al., *Blackberry extract inhibits UVB-induced oxidative damage and inflammation through MAP kinases and NF- κ B signaling pathways in SKH-1 mice skin*, Toxicology and Applied Pharmacology, 2015. 284(1): p. 92-99.
65. Prior, R. L., E. Wilkes, S., R. Rogers, T., Khanal, R. C., et al., *Purified Blueberry Anthocyanins and Blueberry Juice Alter Development of Obesity in Mice Fed an*

- Obesogenic High-Fat Diet*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. 58(7): p. 3970-3976.
66. Jung, K.-A. and Kwak, M.-K., *The Nrf2 System as a Potential Target for the Development of Indirect Antioxidants*, Molecules, 2010. 15(10): p. 7266.
67. Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S. K., and McCord, J. M., *Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation*, Molecular Aspects of Medicine, 2011. 32(4): p. 234-246.
68. Shih, P.-H., Hwang, S.-L., Yeh, C.-T., and Yen, G.-C., *Synergistic Effect of Cyanidin and PPAR Agonist against Nonalcoholic Steatohepatitis-Mediated Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity through MAPK and Nrf2 Transduction Pathways*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. 60(11): p. 2924-2933.
69. Zaidi, Z. and Lanigan, S. W., *Skin: Structure and Function*, in *Dermatology in Clinical Practice*, S.W. Lanigan and Z. Zaidi, Editors. 2010, Springer London: London. p. 1-15.
70. Montagna, W. and Parakkal, P. F., 2 - *The Epidermis*, in *The Structure & Function of Skin (Third Edition)*. 1974, Academic Press. p. 18-74.
71. Montagna, W. and Parakkal, P. F., 4 - *The Dermis*, in *The Structure & Function of Skin (Third Edition)*. 1974, Academic Press. p. 96-141.
72. Rattan, S. I. S., *Theories of biological aging: Genes, proteins, and free radicals*, Free Radical Research, 2006. 40(12): p. 1230-1238.
73. Wei, Y.-H. and Lee, H.-C., *Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Mutation, and Impairment of Antioxidant Enzymes in Aging*, Experimental Biology and Medicine, 2002. 227(9): p. 671-682.
74. Knight, J. A., *The biochemistry of aging*, Advances in Clinical Chemistry, 2001. 35: p. 1-62.
75. Callaghan, T. M. and Wilhelm, K. P., *A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part I: Cellular and molecular perspectives of skin ageing*, International Journal of Cosmetic Science, 2008. 30(5): p. 313-322.
76. Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., and Maibach, H. I., *Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review*, International Journal of Cosmetic Science, 2008. 30(2): p. 87-95.
77. Oba, A. and Edwards, C., *Relationships between changes in mechanical properties of the skin, wrinkling, and destruction of dermal collagen fiber bundles caused by photoaging*, Skin Research and Technology, 2006. 12(4): p. 283-288.

78. D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., and Scott, T., *UV Radiation and the Skin*, International Journal of Molecular Sciences, 2013. 14(6): p. 12222-12248.
79. Chung, J. H., Seo, J. Y., Choi, H. R., Lee, M. K., et al., *Modulation of Skin Collagen Metabolism in Aged and Photoaged Human Skin In Vivo*, Journal of Investigative Dermatology, 2001. 117(5): p. 1218-1224.
80. Harman, D., *Free Radical Theory of Aging: An Update*, Annals of the New York Academy of Sciences, 2006. 1067(1): p. 10-21.
81. Sander, C. S., Chang, H., Salzmänn, S., Müller, C. S. L., et al., *Photoaging is Associated with Protein Oxidation in Human Skin In Vivo*, Journal of Investigative Dermatology. 118(4): p. 618-625.
82. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., et al., *Oxidative Stress and Antioxidant Defense*, The World Allergy Organization journal, 2012. 5(1): p. 9-19.
83. Wlaschek, M., Tanchcheva-Poór, I., Naderi, L., Ma, W., et al., *Solar UV irradiation and dermal photoaging*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2001. 63(1): p. 41-51.
84. Thring, T. S. A., Hili, P., and Naughton, D. P., *Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants*, BMC Complementary and Alternative Medicine, 2009. 9: p. 27-27.
85. Lee, K. K., Cho, J. J., Park, E. J., and Choi, J. D., *Anti-elastase and anti-hyaluronidase of phenolic substance from Areca catechu as a new anti-ageing agent*, International Journal of Cosmetic Science, 2001. 23(6): p. 341-346.
86. Kim, Y.-J., Uyama, H., and Kobayashi, S., *Inhibition effects of (+)-catechin-aldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004. 320(1): p. 256-261.
87. Ganceviciene, R., Liakou, A. I., Theodoridis, A., Makrantonaki, E., et al., *Skin anti-aging strategies*, Dermato-endocrinology, 2012. 4(3): p. 308-319.
88. Lin, F.-H., Lin, J.-Y., Gupta, R. D., Tournas, J. A., et al., *Ferulic Acid Stabilizes a Solution of Vitamins C and E and Doubles its Photoprotection of Skin*, Journal of Investigative Dermatology, 2005. 125(4): p. 826-832.
89. Krol, E. S., Kramer-Stickland, K. A., and Liebler, D. C., *Photoprotective Actions of Topically Applied Vitamin E*, Drug Metabolism Reviews, 2000. 32(3-4): p. 413-420.
90. Murapa, P., Dai, J., Chung, M., Mumper, R. J., et al., *Anthocyanin-rich Fractions of Blackberry Extracts Reduce UV-induced Free Radicals and Oxidative Damage in Keratinocytes*, Phytotherapy Research, 2012. 26(1): p. 106-112.

91. Tsoyi, K., Park, H. B., Kim, Y. M., Chung, J. I., et al., *Protective Effect of Anthocyanins from Black Soybean Seed Coats on UVB-Induced Apoptotic Cell Death in Vitro and in Vivo*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. 56(22): p. 10600-10605.
92. Afaq, F., Syed, D. N., Malik, A., Hadi, N., et al., *Delphinidin, an Anthocyanidin in Pigmented Fruits and Vegetables, Protects Human HaCaT Keratinocytes and Mouse Skin Against UVB-Mediated Oxidative Stress and Apoptosis*, Journal of Investigative Dermatology, 2007. 127(1): p. 222-232.
93. Gosain, A. and DiPietro, L. A., *Aging and Wound Healing*, World Journal of Surgery, 2004. 28(3): p. 321-326.
94. Clarkson, A., *Chapter XIV - The Skin, Epidermic, Appendages, and Terminations of Sensory Nerves*, A Text-Book of Histology, 2013: p. 408-438.
95. Xu, L., Choi, T. H., Kim, S., Kim, S.-H., et al., *Anthocyanins From Black Soybean Seed Coat Enhance Wound Healing*, Annals of Plastic Surgery, 2013. 71(4): p. 415-420.
96. Fernandes, I., de Freitas, V., Reis, C., and Mateus, N., *A new approach on the gastric absorption of anthocyanins*, Food & Function, 2012. 3(5): p. 508-516.
97. Giaever, I. and Keese, C. R., *Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984. 81(12): p. 3761-3764.
98. Keese, C. R., Karra, N., Dillon, B., Goldberg, A. M., et al., *Cell-substratum interactions as a predictor of cytotoxicity*, In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 1998. 11(2): p. 183-192.
99. Giaever, I. and Keese, C. R., *Micromotion of mammalian cells measured electrically*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. 88(17): p. 7896-7900.
100. Giaever, I. and Keese, C. R., *A morphological biosensor for mammalian cells*, Nature, 1993. 366(6455): p. 591-592.
101. Jiang, W. G., Ye, L., Sanders, A. J., Ruge, F., et al., *Prostate transglutaminase (TGase-4, TGaseP) enhances the adhesion of prostate cancer cells to extracellular matrix, the potential role of TGase-core domain*, Journal of Translational Medicine, 2013. 11(1): p. 269.
102. Aikio, M., Alahuhta, I., Nurmenniemi, S., Suojanen, J., et al., *Arresten, a Collagen-Derived Angiogenesis Inhibitor, Suppresses Invasion of Squamous Cell Carcinoma*, PLOS ONE, 2012. 7(12): p. e51044.

103. Bondu, V., Schrader, R., Gawinowicz, M., McGuire, P., et al., *Elevated Cytokines, Thrombin and PAI-1 in Severe HCPS Patients Due to Sin Nombre Virus*, *Viruses*, 2015. 7(2): p. 559.
104. Mirzapoziova, T., Lennon, F. E., Mambetsariev, B., Allen, M., et al., *Extracellular Vesicles from Caveolin-Enriched Microdomains Regulate Hyaluronan-Mediated Sustained Vascular Integrity*, *International Journal of Cell Biology*, 2015. 2015: p. 11.
105. Boratkó, A. and Csontos, C., *NHERF2 is crucial in ERM phosphorylation in pulmonary endothelial cells*, *Cell Communication and Signaling*, 2013. 11(1): p. 99.
106. Müller, J., Thirion, C., and Pfaffl, M. W., *Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) based real-time measurement of titer dependent cytotoxicity induced by adenoviral vectors in an IPI-2I cell culture model*, *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. 26(5): p. 2000-2005.
107. Xie, F., Xu, Y., Wang, L., Mitchelson, K., et al., *Use of cellular electrical impedance sensing to assess in vitro cytotoxicity of anticancer drugs in a human kidney cell nephrotoxicity model*, *Analyst*, 2012. 137(6): p. 1343-1350.
108. Gong, H., Gao, X., Feng, S., Siddiqui, M. R., et al., *Evidence of a common mechanism of disassembly of adherens junctions through Ga13 targeting of VE-cadherin*, *The Journal of Experimental Medicine*, 2014. 211(3): p. 579-591.
109. Laroui, H., Geem, D., Xiao, B., Viennois, E., et al., *Targeting Intestinal Inflammation With CD98 siRNA/PEI-loaded Nanoparticles*, *Molecular Therapy*, 2014. 22(1): p. 69-80.
110. Ochoa-Callejero, L., Pozo-Rodrigálvarez, A., Martínez-Murillo, R., and Martínez, A., *Lack of adrenomedullin in mouse endothelial cells results in defective angiogenesis, enhanced vascular permeability, less metastasis, and more brain damage*, 2016. 6: p. 33495.
111. Chen, Y.-W., Chen, J.-K., and Wang, J.-S., *Exercise affects platelet-promoted tumor cell adhesion and invasion to endothelium*, *European Journal of Applied Physiology*, 2008. 105(3): p. 393.
112. Lembo, A., Gurney, M. A., Burnside, K., Banerjee, A., et al., *Regulation of CovR expression in Group B Streptococcus impacts blood-brain barrier penetration*, *Molecular Microbiology*, 2010. 77(2): p. 431-443.
113. Opp, D., Wafula, B., Lim, J., Huang, E., et al., *Use of electric cell-substrate impedance sensing to assess in vitro cytotoxicity*, *Biosensors and Bioelectronics*, 2009. 24(8): p. 2625-2629.

114. Fang, Z. and Bhandari, B., *Encapsulation of polyphenols – a review*, Trends in Food Science & Technology, 2010. 21(10): p. 510-523.
115. Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Ghorbani, M., and Assadpoor, E., *Spray-Drying Microencapsulation of Anthocyanins by Natural Biopolymers: A Review*, Drying Technology, 2014. 32(5): p. 509-518.
116. Zhong, Y. and Shahidi, F., *Lipophilized Epigallocatechin Gallate (EGCG) Derivatives as Novel Antioxidants*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. 59(12): p. 6526-6533.
117. Cruz, L., Fernandes, I., Guimaraes, M., de Freitas, V., et al., *Enzymatic synthesis, structural characterization and antioxidant capacity assessment of a new lipophilic malvidin-3-glucoside-oleic acid conjugate*, Food & Function, 2016. 7(6): p. 2754-2762.
118. Barclay, L. R. C. and Ingold, K. U., *Autoxidation of biological molecules. 2. Autoxidation of a model membrane. Comparison of the autoxidation of egg lecithin phosphatidylcholine in water and in chlorobenzene*, Journal of the American Chemical Society, 1981. 103(21): p. 6478-6485.
119. Oliveira, H., Fernandes, I., Brás, N. F., Faria, A., et al., *Experimental and Theoretical Data on the Mechanism by Which Red Wine Anthocyanins Are Transported through a Human MKN-28 Gastric Cell Model*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015. 63(35): p. 7685-7692.
120. Szulcek, R., Bogaard, H. J., and van Nieuw Amerongen, G. P., *Electric Cell-substrate Impedance Sensing for the Quantification of Endothelial Proliferation, Barrier Function, and Motility*, Journal of Visualized Experiments : JoVE, 2014(85): p. 51300.
121. Malinin, T. I. and Perry, V. P., *Toxicity of dimethyl sulfoxide on HeLa cells*, Cryobiology, 1967. 4(2): p. 90-96.
122. Da Violante, G., Zerrouk, N., Richard, I., Provot, G., et al., *Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures*, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2002. 25(12): p. 1600-1603.
123. Opp, D., Wafula, B., Lim, J., Huang, E., et al., *Use of electric cell-substrate impedance sensing to assess in vitro cytotoxicity*, Biosensors & bioelectronics, 2009. 24(8): p. 2625-2629.
124. Brás, N. F., Gonçalves, R., Mateus, N., Fernandes, P. A., et al., *Inhibition of Pancreatic Elastase by Polyphenolic Compounds*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. 58(19): p. 10668-10676.

125. Kubo, I., Chen, Q.-X., Nihei, K.-I., Calderón José, S., et al., *Tyrosinase Inhibition Kinetics of Anisic Acid*, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2003. 58(9-10): p. 713.
126. Cruz, L., Fernandes, V. C., Araújo, P., Mateus, N., et al., *Synthesis, characterisation and antioxidant features of procyanidin B4 and malvidin-3-glucoside stearic acid derivatives*, *Food Chemistry*, 2015. 174: p. 480-486.
127. Soto, M., Falqué, E., and Domínguez, H., *Relevance of Natural Phenolics from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics*, *Cosmetics*, 2015. 2(3): p. 259.
128. Opp, D., *Ecis Assessment of Cytotoxicity and Trans-Endothelial Migration of Metastatic Cancer Cells*, 2011.
129. Balasundram, N., Sundram, K., and Samman, S., *Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses*, *Food Chemistry*, 2006. 99(1): p. 191-203.
130. Selani, M. M., Contreras-Castillo, C. J., Shirahigue, L. D., Gallo, C. R., et al., *Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage*, *Meat Science*, 2011. 88(3): p. 397-403.
131. Chow, S.-E., Chen, C. P.-C., Hsu, C.-C., Tsai, W.-C., et al., *Quantifying cell behaviors in negative-pressure induced monolayer cell movement*, *Biomedical Journal*, 2016. 39(1): p. 50-59.
132. Nizamutdinova, I. T., Kim, Y. M., Chung, J. I., Shin, S. C., et al., *Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells*, *Food and Chemical Toxicology*, 2009. 47(11): p. 2806-2812.
133. Marangoni, A. G., *Reversible Enzyme Inhibition*, in *Enzyme Kinetics*. 2003, John Wiley & Sons, Inc. p. 61-69.
134. Abdul Karim, A., Azlan, A., Ismail, A., Hashim, P., et al., *Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract*, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2014. 14: p. 381.
135. Sin, B. Y. and Kim, H. P., *Inhibition of collagenase by naturally-occurring flavonoids*, *Archives of Pharmacal Research*, 2005. 28(10): p. 1152-1155.
136. Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Vieira, W., and Virador, V. M., *Effects of Wine Phenolics and Sorghum Tannins on Tyrosinase Activity and Growth of Melanoma Cells*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. 49(3): p. 1620-1624.
137. Tsuda, T. and Osawa, T., *Inhibition of Tyrosinase Activity by the Anthocyanin Pigments Isolated from Phaseolus vulgaris*, *Food Science and Technology International*, Tokyo, 1997. 3(1): p. 82-83.

138. Viskupicova, J., Danihelova, M., Majekova, M., Liptaj, T., et al., *Polyphenol fatty acid esters as serine protease inhibitors: a quantum-chemical QSAR analysis*, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2012. 27(6): p. 800-809.
139. Shahidi, F. and Zhong, Y., *Revisiting the Polar Paradox Theory: A Critical Overview*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. 59(8): p. 3499-3504.
140. Laguerre, M., López Giraldo, L. J., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.-C., et al., *Chain Length Affects Antioxidant Properties of Chlorogenate Esters in Emulsion: The Cutoff Theory Behind the Polar Paradox*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. 57(23): p. 11335-11342.